

Влияние размера ДНК-мишени на эффективность измерения химеризма в циркулирующей свободной ДНК плазмы

Е.Е. Никулина^{✉1}, Н.В. Рисинская¹, О.Е. Дубова^{1,2}, О.В. Сумцова³,
Я.Г. Мойсюк³, В.А. Васильева¹, М.В. Соловьева¹, А.А. Юшкова¹, И.С. Февралева¹,
А.С. Скрипкина^{1,2}, А.А. Макарик⁴, А.Б. Судариков¹

¹ ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ,
125167, Россия, Москва, Новый Зыковский пр-д, д. 4;

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет),
119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

³ ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского,
129110, Россия, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2;

⁴ ГБУЗ МОНИАГ им. В.И. Краснопольского,
101000, Россия, Москва, ул. Покровка, д. 22А

✉ Автор, ответственный за переписку: Елена Евгеньевна Никулина, научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии НМИЦ гематологии, lenysh2007@rambler.ru

Аннотация

Актуальность. Анализ свободной циркулирующей ДНК открывает перспективы для молекулярной диагностики, однако ее фрагментация и низкая концентрация в крови могут осложнить проведение ПЦР.

Цель. Изучить влияние длины мишени на эффективность амплификации маркеров Y-хромосомы из свободной циркулирующей ДНК.

Материал и методы. Пятьдесят образцов свободной циркулирующей ДНК полученных от 39 пациентов: после трансплантации печени (n=19), с острым лейкозом после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (n=10) и беременных женщин (n=10). Кроме того, мы подготовили 16 образцов химер путем последовательного разведения мужской свободной циркулирующей ДНК в женской свободной циркулирующей ДНК от здоровых доноров. Мы определили долю мужской свободной циркулирующей ДНК с помощью маркера Y-хромосомы S02, длина которого составляет 211 пар нуклеотидов, как было предложено M. Alizadeh et al. Мы также модифицировали дизайн праймеров Alizadeh для получения ДНК-мишени длиной 138 пар нуклеотидов. Доля мужской свободной циркулирующей ДНК также определялась с помощью фрагментного анализа с использованием маркера амелогенина Y (84 пар нуклеотидов) из набора COrDIS Plus (ООО «Гордиз», Россия).

Результаты. В трех группах пациентов амплификация мужской свободной циркулирующей ДНК была более эффективной при использовании более коротких ДНК-мишеней (p<0,05). В искусственно созданных «химерах» с известным соотношением мужской и женской свободной циркулирующей ДНК анализ маркера длиной 84 пары нуклеотидов давал значения, наиболее близкие к реальным.

Выводы. В количественных моделях, протестированных на данный момент, более короткие ПЦР-мишени предпочтительнее для анализа свободной циркулирующей ДНК.

Ключевые слова: свободно циркулирующая ДНК, ДНК-мишень, химеризм, трансплантация печени, аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток, беременность

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ), проект № 23-25-00490. URL: www.rscf.ru/en/project/23-25-00490/

Для цитирования: Никулина Е.Е., Рисинская Н.В., Дубова О.Е., Сумцова О.В., Мойсюк Я.Г., Васильева В.А. и др. Влияние размера ДНК-мишени на эффективность измерения химеризма в циркулирующей свободной ДНК плазмы. *Трансплантология*. 2024;16(4):458–472. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2024-16-4-458-472>

© Никулина Е.Е., Рисинская Н.В., Дубова О.Е., Сумцова О.В., Мойсюк Я.Г., Васильева В.А., Соловьева М.В., Юшкова А.А., Февралева И.С., Скрипкина А.С., Макарик А.А., Судариков А.Б., 2024

Effect of DNA target size on the efficiency of chimerism measurement in circulating free plasma DNA

E.E. Nikulina^{✉1}, N.V. Risinskaya¹, O.E. Dubova^{1,2}, O.V. Sumtsova³,
Ya.G. Moysyuk³, V.A. Vasilieva¹, M.V. Soloveva¹, A.A. Yushkova¹, I.S. Fevrileva¹,
A.S. Skripkina^{1,2}, A.A. Makarik⁴, A.B. Sudarikov¹

¹ National Medical Research Center for Hematology,
4 Noviy Zykovskiy Dr., Moscow 125167 Russia;

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
8 Bldg. 2 Trubetskaya St., Moscow 119991 Russia;

³ Moscow Regional Research and Clinical Institute n.a. M.F. Vladimirovskiy,
61/2 Shchepkin St., Moscow 129110 Russia;

⁴ Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology n.a. Acad. V.I. Krasnopolsky,
22A Pokrovka St., Moscow 101000 Russia

✉Corresponding author: Elena E. Nikulina, Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology, lenysh2007@rambler.ru

Abstract

Introduction. The analysis of free circulating DNA (cfDNA) holds promise for molecular diagnostics, but its fragmentation and low concentration can complicate PCR analysis.

Objective. To investigate the effect of target length on the amplification efficiency of Y-chromosome markers from cfDNA.

Material and methods. Fifty cfDNA samples were obtained from 39 patients: patients after liver transplantation (n=19), patients with acute leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (n=10), and pregnant women (n=10). In addition, we prepared 16 chimeric samples by sequential dilution of male cfDNA into female cfDNA from healthy donors. We determined the proportion of male cfDNA using the Y-chromosome marker S02, which is 211 bp in length as suggested by M. Alizadeh et al. We also modified Alizadeh's primer design to obtain a DNA target with a length of 138 bp. The proportion of male cfDNA was also determined by fragment analysis using the amelogenin Y marker (84 bp) from the COReDIS Plus kit (Gordiz LLC, Russia).

Results. In the three groups of patients, amplification of male cfDNA was more efficient when shorter DNA targets were used (p<0.05). In artificially created 'chimeras' with a known ratio of male to female cfDNA, analysis of a marker of 84 bp in length gave values closest to the real ones.

Conclusions. In the quantitative models tested so far, shorter PCR targets are preferred for the analysis of cfDNA.

Keywords: free circulating DNA, target DNA, chimerism, liver transplantation, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, pregnancy

CONFLICT OF INTERESTS Authors declare no conflict of interest

FINANCING The research was financially supported by the Russian Science Foundation (RNF), project No. 23-25-00490. Available at: www.rscf.ru/en/project/23-25-00490/

For citation: Nikulina EE, Risinskaya NV, Dubova OE, Sumtsova OV, Moysyuk YaG, Vasilieva VA, et al. Effect of DNA target size on the efficiency of chimerism measurement in circulating free plasma DNA. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2024;16(4):458–472. (In Russ.). <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2024-16-4-458-472>

алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
ДБКЛ – диффузная В-крупноклеточная лимфома
дсцДНК – свободно циркулирующая ДНК донора
ММ – множественная миелома
НИПТ – неинвазивное пренатальное тестирование
ОЛ – острый лейкоз
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
ОО – острое отторжение
ОРТПХ – острая реакция «трансплантат против хозяина»
п.н. – пара нуклеотидов

ПМБКЛ – первичная медиастинальная (тимическая) В-клеточная лимфома
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»
сцДНК – свободная циркулирующая ДНК
ФА – фрагментный анализ
фсцДНК – фетальная свободно циркулирующая ДНК
ФФ – фетальная фракция
ХММЛ – хронический миеломоноцитарный лейкоз
NGS – секвенирование следующего поколения
SNP – однонуклеотидные полиморфизмы

Введение

Анализ свободной циркулирующей ДНК (сцДНК) является перспективным методом молекулярной диагностики. Он приобрел особое значение по нескольким причинам. В настоящее время активно изучается прогностическая ценность фракций сцДНК донора/реципиента в плазме крови при трансплантации органов и костного мозга. Кроме того, требуются более чувствительные подходы для определения доли опухолевой сцДНК у пациентов с онкологическими заболеваниями, включая онкогематологических больных. Определение молекулярных маркеров в сцДНК плода давно используется в пренатальном скрининге.

В связи с развитием трансплантологии возникла необходимость в неинвазивных методах диагностики, позволяющих прогнозировать несостоятельность трансплантата. Исследователи ищут новые биомаркеры для выявления отторжения, бессимптомного повреждения трансплантата и недостаточности иммуносупрессии. Одним из потенциальных маркеров является сцДНК донора (дсцДНК), которую можно обнаружить в крови и других биологических жидкостях. Это может помочь выявить осложнения, связанные с отторжением трансплантата и инфекционными процессами, на ранней стадии [1]. На сегодняшний день опубликовано множество клинических исследований, убедительно свидетельствующих о возможности использования дсцДНК для мониторинга состояния трансплантата [2, 3]. Увеличение содержания ее фракции в плазме крови обычно ассоциируется с нарушением функционирования трансплантата вплоть до его отторжения. Наиболее активно дсцДНК изучается в трансплантации органов в качестве неинвазивного и точного биомаркера для мониторинга состояния трансплантата печени.

Аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток (алло-ТГСК) обеспечивает эффективное лечение неоплазий и неопухолевых заболеваний кроветворной ткани. Мониторинг посттрансплантационных осложнений крайне важен, но современные диагностические возможности ограничены. Соотношение фрагментов сцДНК донорского и хозяйского происхождения в плазме крови используется в качестве универсального показателя для мониторинга наиболее важных осложнений, возникающих после алло-ТГСК: рецидива злокачественного новообразования и отторжения трансплантата [4]. Для выявления отторжения

трансплантата в образцах плазмы измеряется доля сцДНК донора и реципиента [5]. Для подтверждения рецидива параллельно проводится анализ на наличие опухолеспецифических геномных повреждений в сцДНК [6].

Основными причинами перинатальной летальности и детской инвалидности являются хромосомные аномалии, такие как анеуплоидия 21-й, 18-й и 13-й хромосом. Анеуплоидная беременность может приводить к единичным выкидышам, частым кровотечениям и преждевременным родам [7]. Ультразвуковое исследование, определение маркеров в сыворотке крови матери и компьютерный анализ – основные методы, используемые для скрининга беременных. Эти методы помогают выявить женщин с высоким риском указанных выше осложнений беременности, которым требуется инвазивное обследование [8]. Инвазивные процедуры, такие как биопсия ворсин хориона и амниоцентез, используются для получения образцов для цитогенетического исследования; кордоцентез используется реже. Проведение этих процедур требует тщательного учета противопоказаний из-за потенциального риска осложнений, в том числе спонтанного прерывания беременности, которое происходит в 1–2% случаев. После обнаружения в 1997 году ДНК Y-хромосомы, циркулирующей в материнском кровотоке [9], началась разработка и активное внедрение неинвазивного пренатального тестирования (НИПТ). Многочисленные клинические исследования показали, что количество внеклеточной ДНК плода – фетальной сцДНК (фсцДНК) является важнейшим параметром для НИПТ, так как ее недостаточное количество может привести к ложноотрицательным результатам [10, 11]. Злокачественные новообразования, материнский и плацентарный мозаицизм также могут стать причиной расхождений между кариотипом плода и результатами НИПТ [11, 12]. С помощью секвенирования следующего поколения (NGS) можно не только определить долю фетальной сцДНК, но и генетически идентифицировать образец. Помимо пренатальной диагностики этот подход может быть использован для неинвазивного определения отцовства.

Для всех этих исследований необходимо статистически значимо оценить долю сцДНК плода, донора, хозяина и опухоли, которая присутствует в крови во фрагментированном виде. Размер этих фрагментов обычно варьирует от 70 до 200 пар нуклеотидов (п.н.), хотя при злокачественных заболеваниях встречаются фрагменты длиной до

нескольких тысяч пар нуклеотидов [13]. Основной механизм фрагментации сцДНК – нуклеазное расщепление ДНК в участках, не защищенных нуклеосомами. В основном сцДНК высвобождается из нормальных и опухолевых клеток при апоптозе или некрозе (пассивное высвобождение) и активной клеточной секреции внеклеточных везикул и экзосом (активное высвобождение). Попадая в межклеточную жидкость, нуклеиновые кислоты свободно циркулируют в плазме крови и других жидкостях организма: слюне, ликворе и моче. Средний период полураспада сцДНК в крови составляет 10–15 мин [14]. Выведение сцДНК из организма происходит через печень и почки. У здоровых людей уровень сцДНК обычно невелик и составляет в среднем около 5 нг/мл плазмы крови. Этот показатель может повышаться в ответ на физическую активность, воспаление, травму или иные физиологические и патологические воздействия. Концентрация сцДНК считается неспецифическим маркером и может указывать на наличие заболеваний различного характера, включая онкологические, инфекционные, а также связанные с патологией органной трансплантации.

Целью данной работы является исследование эффективности обнаружения целевой (донорской, фетальной) сцДНК в зависимости от длины ДНК-мишени для ПЦР-амплификации.

Материал и методы

В исследование включено 50 образцов сцДНК от 39 пациентов. Для исследования были отобраны три группы пациентов: пациенты, перенесшие трансплантацию печени в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского и находившиеся под наблюдением от 6 месяцев до 13 лет; пациенты с острыми лейкозами (ОЛ), получившие аллотГСК в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ и находившиеся под наблюдением от 1 до 50 месяцев; беременные пациентки и сотрудницы ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, находящиеся на I–III триместрах беременности или недавно родившие.

Первая группа состояла из 20 образцов сцДНК от 19 пациентов, которым была проведена трансплантация печени в период от 0,5 до 13 лет до начала исследования (табл. 1).

Вторая группа состояла из 16 образцов, собранных через 1–50 месяцев после аллотГСК у 10 пациентов с ОЛ (табл. 2).

Таблица 1. Характеристика пациентов после трансплантации печени

Table 1. Patient characteristics of patients after liver transplantation

Образец №	Код пациента в исследовании	Пол пациента	Пол донора	Возраст	Срок после трансплантации печени, мес	Концентрация сцДНК в плазме, нг/мл
1	9 Myk	ж	м	68	60	8
2	1 Dmi	ж	м	48	23	11
3	36 Leo	ж	м	52	6	27
4	35 Ger	ж	м	46	59	30
5	12 Fel	ж	м	59	130	10
6	15 Dor	ж	м	43	48	3
7	24 Bar	ж	м	61	161	17
8	16 Skr	ж	м	60	103	2
9	3 Kal	ж	м	48	68	7
10	10 Kob	ж	м	51	102	3
11	41 Bat	ж	м	42	106	70
12	42 Kom	ж	м	62	41	48
13	45 Kuz	ж	м	47	105	23
14	11 TerA	м	ж	58	108	5
15	14 Pav	м	ж	72	127	23
16	37 Gav*	м	м	62	121	32
17	6 Mic	м	ж	51	37	5
18	4 Gas	м	м	51	50	8
19	58 Pas	м	м	49	87	10
20	59 Gav*	м	м	62	133	13

Примечания: * – тот же пациент, наблюдавшийся через 1 год; цифровые обозначения в кодах пациента являются условными; сцДНК – свободно циркулирующая ДНК.

Третья группа включала 14 образцов сцДНК от 10 беременных, 4 из которых были здоровыми донорами, а остальные 6 имели различные диагнозы, включая ММ (множественная миелома), ОМЛ (острый миелоидный лейкоз), ПМБКЛ (первичная медиастинальная (тимическая) В-клеточная лимфома), ДБКЛ (диффузная В-крупноклеточная лимфома) и ХММЛ (хронический миеломоноцитарный лейкоз). Подробная информация представлена в табл. 3.

Кроме того, были созданы две серии искусственных (химерных) образцов сцДНК с разным относительным содержанием мужской сцДНК. Были взяты две пары сцДНК с концентрацией 7 нг/мл от двух здоровых доноров мужского и двух – женского пола и приготовлены серийные разведения мужской сцДНК в женской сцДНК. Образцы с разведениями 1/3, 1/9, 1/27, 1/81,

Таблица 2. Характеристика больных острым лейкозом после аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток

Table 2. Characteristics of acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation

Образец №	Код пациента в исследовании	Пол	Возраст	Диагноз	Пол донора	Срок после алло-ТГСК, мес	Концентрация сцДНК в плазме, нг/мл
1	Gra*	м	35	ОЛЛ	ж	50	35
2	Gra*	м	35	ОЛЛ	ж	50	33
3	Gra*	м	35	ОЛЛ	ж	50	37
4	174–999 Mol**	м	55	ОЛЛ	ж	3	63
5	171–708 Gog	м	20	ОМЛ	ж	2	75
6	174–206 Ana***	м	64	ОМЛ	ж	1	30
7	1734–760 Mol**	м	55	ОЛЛ	ж	1	260
8	174–561 Vas****	м	20	ОМЛ	ж	3	40
9	173–534 Che	м	48	ОМЛ	ж	49	27
10	175–799 Izm	м	36	ОМЛ	ж	1	90
11	175–887 Ana***	м	64	ОМЛ	ж	2	30
12	172–865 Vas****	м	20	ОМЛ	ж	2	85
13	1512 Gal	ж	28	ОМЛ	м	5	57
14	174–817 Iva*****	ж	57	ОМЛ	м	6	21
15	174–705 Kar	ж	23	ОМЛ	м	2	33
16	173–606 Iva*****	ж	57	ОМЛ	м	3	33

Примечания: *, ** – пациентки, у которых образцы были взяты трижды на разных этапах беременности и после родов; цифровые обозначения в кодах пациента являются условными; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз, ОМЛ – острый миелоидный лейкоз, алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, сцДНК – свободно циркулирующая ДНК

1/243 и 1/729 и контрольные образцы сцДНК без разведений также были исследованы с помощью трех методов для определения количества сцДНК с маркерами Y-хромосомы.

Образцы крови (8–10 мл) собирали в пробирки с этилендиаминтетраацетатом. Обработку образцов проводили не позднее чем через 2 часа после взятия. Плазму получали из цельной крови путем трехкратного центрифугирования: первый раз при ускорении 800 g в течение 15 минут; второй – при ускорении 2500 g в течение 20 минут; и третий раз при максимальных оборотах в течение 15 минут для удаления клеточного дебриса [15, 16].

Процедуру выделения сцДНК проводили из 1,5 мл плазмы крови с помощью коммерческого набора “CF Extra” (Raissol Bio, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Методика выделения нуклеиновых кислот из сцДНК основана на концентрировании мелких фрагмен-

Таблица 3. Характеристика беременных первой группы исследования, ранжированных по количеству мужской сцДНК плода

Table 3. Characteristics of pregnant women in the first study group ranked by the amount of male cfDNA in the fetus

Образец №	Код пациента в исследовании	Возраст, лет	Статус (донор/пациент, диагноз)	Срок беременности	Пол ребенка	Концентрация сцДНК в плазме, нг/мл
1	151–269 Sve	36	донор	12 нед	ж	5
2	150–833 Xas*	41	ММ	8 мес после родов	м	11
3	160–866 Sol**	37	донор	3 мес после родов	м	5
4	166–576 Gla	34	донор	10 нед	ж	6
5	172–939 Shm	37	ПМБКЛ	36 нед	ж	53
6	151–853 Vor	40	ОМЛ	27 нед	ж	20
7	154–517 Sol**	37	донор	33–34 нед	м	19
8	154–197 Xas*	41	ММ	10 мес после родов	м	10
9	155–958 Bet	34	ПМБКЛ	35–36 нед	м	8
10	159–783 Erm	35	ДБККЛ	27 нед	м	23
11	154–100 Shp	39	ХММЛ	24–25 нед	м	27
12	149–89 Sol**	37	донор	9 нед	м	5
13	151–200 Ler	26	донор	22 нед	м	8
14	141–633 Xas*	41	ММ	38 нед	м	18

Примечания: *, ** – пациентки, у которых образцы были взяты трижды на разных этапах беременности и после родов; цифровые обозначения в кодах пациента являются условными; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз, ММ – множественная миелома, ДБККЛ – диффузная В-крупноклеточная лимфома, ПМБКЛ – первичная медиастинальная (тимическая) В-клеточная лимфома, ХММЛ – хронический миеломоноцитарный лейкоз, сцДНК – свободно циркулирующая ДНК

тов ДНК магнитными частицами с последующей очисткой. Полученную сцДНК растворяли в 30–50 мкл элюирующего буфера “CF Extra” (Raissol Bio, Россия). Мы использовали метод получения сцДНК и контрольной геномной ДНК (референсные клеточные образцы) из одной пробирки. ДНК из осадка клеток крови выделяли методом солевой экстракции [17].

Концентрацию выделенной сцДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) с набором для количественного определения образцов с низким содержанием ДНК (Raissol Bio, Россия).

Относительное количество ДНК мужского происхождения, содержащей маркер Y-хромосомы, оценивали для всех групп. Для ПЦР в реальном времени использовали праймеры и зонды, определяющие маркер S02 на Y-хромосоме, как предложено M. Alizadeh et

al. [18]. При исследовании геномной ДНК эта тест-система позволяет выявлять минорную ДНК с точностью до 0,03%; длина целевой ДНК составляет 211 п.н. Для нормализации использовали ген GAPDH; праймеры и зонды также предложены М. Alizadeh et al. (длина целевой ДНК – 188 п.н.). Кроме того, мы модифицировали прямой (неспецифический) праймер из набора Alizadeh, чтобы сделать мишень амплификации короче (138 п.н.). Праймеры и последовательности амплифицированных фрагментов представлены на рис. 1.

F 5' TTACGAGCCCATGGGTGGA3'
R 5' GCTTGCTGGCGGACCT3' (Y-specific)
5' FAM CACGGGGATGATTTGGTGGTCAG3' RTQ1

C AGGCATCAGT **GCTTGCTGGCGGACCT** GGGC
TGCTGAGCTGGCACCACCTGGGATGTGGTGATGA
GACTGCAGGGTGTGAGTCAGGGGGTGTCTTTG
GGACAC **CACGGGGATGATTTGGTGGTCAGCC**
ATCCACCCATGGGCTCGTAA CCATAGGAAGAGT
ACTGGTGAGAAACAGAGATGCAGGTTTACCATT
GGCTCA **CGTGACTCCAACCAGAGAAGC** AGCAG
TGTTGTCTTTGCCATTATGGCCATAGGAATATTGT
ATTTATCTTTCSTTTGCAAAAATTTGTAACGTGT
ACACAGACATGATTTTTCACAAATAAATTTCCC
ATAGTGTC

Рис. 1. Схема расположения праймеров и зонда для определения ДНК-мишени Y-хромосомы в классической и модифицированной тест-системах. Розовый цвет – прямой и обратный праймеры (ДНК-мишень 211 п.н.), предложенные М. Alizadeh et al.; зеленый цвет – флуоресцентный зонд; желтый цвет – новый прямой праймер (ДНК-мишень 138 п.н.)

Fig. 1. Scheme of primer and probe arrangements to determine the DNA target of Y-chromosome in classical and modified test systems. Pink color designates the forward and reverse primers (DNA target with a length, 211 bp) proposed by M. Alizadeh et al.; green color designates fluorescent probe; yellow color designates a new forward primer (DNA target, 138 bp)

Относительное количество мужской сДНК рассчитывали по методу $\Delta\Delta C_t$. Для расчета использовали формулу

$$QU/QC = (1 + E) - (\Delta C_tU - \Delta C_tC),$$

где QU – количество последовательности целевой ДНК в неизвестном образце; QC – количество последовательности целевой ДНК в калибраторном образце; ΔC_tU – ΔC_t в неизвестном образце; ΔC_tC – ΔC_t в калибраторном образце; E – эффективность ПЦР последовательности целевой ДНК, рассчитанная, как описано М. Alizadeh et al. [18].

Параллельно каждый образец был проанализирован методом фрагментного анализа (ФА) для оценки доли мужской сДНК. Мы использовали маркер амелогенина Y (длина целевой ДНК 84 п.н.) из набора COrDIS Plus для определения STR-профиля пациента (ООО «Гордиз», Россия). В качестве калибратора использовали маркер амелогенина X (80 п.н.) из того же набора. ФА продуктов ПЦР проводили на генетическом анализаторе «Нанофор-05» (SYNTOL, Россия). Анализ STR-профилей проводили с помощью программы GeneMapper v.4 (Applied Biosystems, США). Относительную долю рассчитывали как

$$Y = hY / (hY + hX),$$

где hY и hX – высоты пиков Y (длина ампликона 84 п.н.) и X (длина ампликона 80 п.н.) соответственно. Во всех случаях для ПЦР брали 5 мкл раствора сДНК с концентрацией не менее 0,2 нг/мкл.

Полученные результаты представляли в виде $M \pm SD$ (M – среднее значение, SD – стандартное отклонение). Для сравнения относительной эффективности различных методов использовали t-тест Стьюдента для связанных совокупностей (<https://medstatistic.ru/calculators/calcpars.html>). Различия считали статистически значимыми при величине статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты

Диаграмма на рис. 2 показывает, что концентрация сДНК в трех группах пациентов была достаточно высокой для точного измерения мужской сДНК в этих образцах. В частности, концентрация сДНК от 2 до 70 нг/мл у пациентов после трансплантации печени и от 5 до 53 нг/мл у беременных позволяла обнаружить незначительное количество сДНК, начиная с 1%. Концентрация сДНК от 21 до 90 нг/мл (в одном образце – 260 нг/мл) у пациентов с острым лейкозом после алло-ТГСК предполагает еще более точное обнаружение минорной сДНК и возможность выявления не только маркеров донора и реципиента, но и опухолевых маркеров.

Как видно из табл. 1, из 19 пациентов с пересаженной печенью 14 были женщинами с трансплантацией от донора-мужчины, трое мужчин – от доноров-женщин и трое мужчин – с трансплантацией от донора-мужчины. Как показано на рис. 3, это позволило нам получить распределение относительного количества

мужской сцДНК в широком диапазоне. Следует отметить, что у пациентов 14 (женщина, мужчина-донор) и 15 (мужчина, женщина-донор) на момент забора образцов существовала угроза отторжения трансплантата. У остальных пациентов состояние трансплантата было стабильным, а доля донорской сцДНК не превышала 25% по данным ФА амелогенина Y. Сравнивая три метода анализа, мы обнаружили, что средняя доля мужской сцДНК составила $0,035 \pm 0,079$ при использовании стандартной ПЦР-системы, $0,096 \pm 0,150$ – при использовании модифицированной ПЦР-системы и $0,350 \pm 0,388$ – при ФА с использованием коротких мишеней амелогенина Y и X. Примененный t-тест Стьюдента показал статистически значимую разницу в результатах между первыми двумя ($t=2,919$, $p=0,009$), а также вторым и третьим методами ($t=4,135$, $p=0,001$).

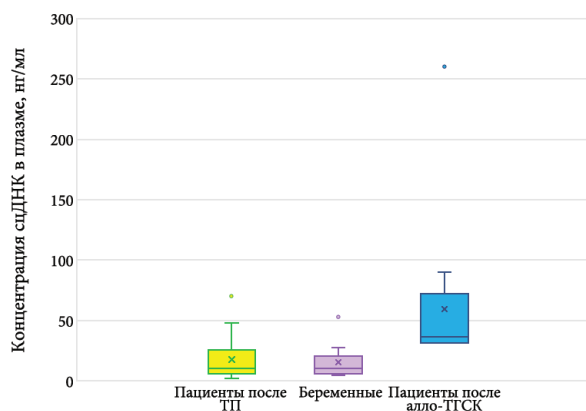


Рис. 2. Диаграмма концентраций сцДНК в изучаемых группах пациентов

Fig. 2. Diagram of cfDNA concentrations in the studied patient groups

Аналогичные результаты были получены в группе пациентов после алло-ТТСК. Как видно из табл. 2, из 16 образцов сцДНК 12 были получены от мужчин-реципиентов, получивших трансплантаты от женщин-доноров, и 4 – от женщин-реципиентов, получивших трансплантаты от мужчин-доноров. В этой группе была обнаружена самая высокая доля мужской сцДНК. Количественные значения доли мужской сцДНК представлены в виде графиков на рис. 4. При сравнении результатов, полученных с помощью стандартной и модифицированной ПЦР-систем, мы обнаружили, что средняя доля сцДНК мужского происхождения составила $0,032 \pm 0,043$ при использовании стандартной системы и $0,150 \pm 0,177$ – при использовании модифицированной системы. Эта разница была статистически

значимой ($p=0,005$) согласно t-тесту Стьюдента. Таким образом, изменение только одного параметра – длины целевой ДНК – при сохранении всех остальных параметров, включая метод нормализации ДНК, привело к увеличению обнаруживаемой доли целевой ДНК почти в 5 раз – от $0,032 \pm 0,043$, до $0,150 \pm 0,177$ (рис. 4).

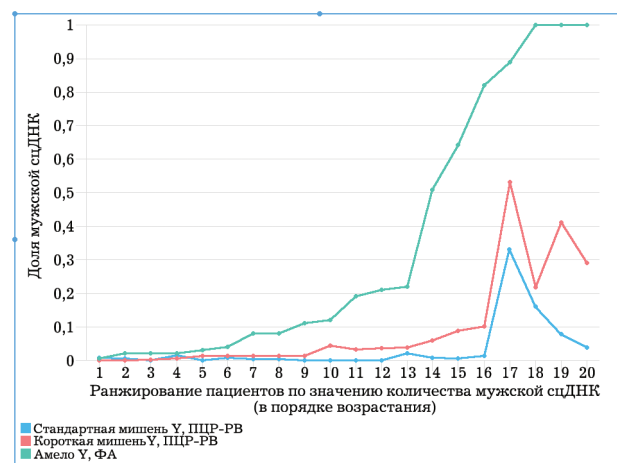


Рис. 3. Распределение относительного количества мужской сцДНК у пациентов после трансплантации печени. ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени сцДНК – свободная циркулирующая ДНК, амелоY – амелогенин Y-хромосомы, ФА – фрагментный анализ

Fig. 3. Distribution of male cfDNA relative amount in the patients after liver transplantation. RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; cfDNA, free circulating DNA; ameloy – amelogenin of Y chromosome; FA, fragment analysis

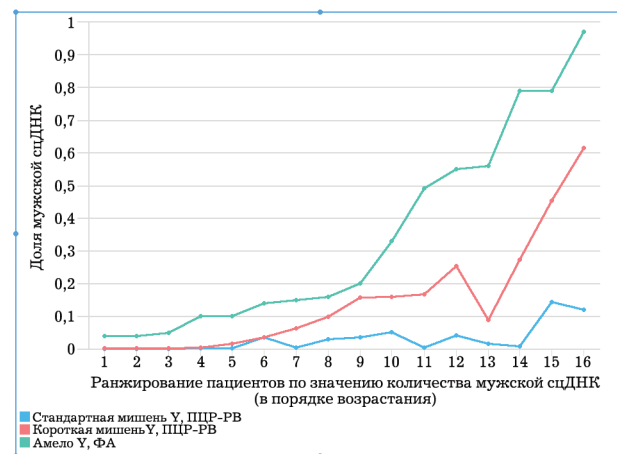


Рис. 4. Распределение относительных количеств мужской сцДНК у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток. ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени, сцДНК – свободная циркулирующая ДНК, амелоY – амелогенин Y-хромосомы, ФА – фрагментный анализ

Fig. 4. Distribution of male cfDNA relative amounts in the patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; cfDNA, free circulating DNA; ameloy – amelogenin of Y chromosome; FA, fragment analysis

Дальнейшее сравнение данных, полученных при помощи ПЦР в реальном времени (РВ), с результатами ФА коротких мишеней амелогенина Y и контрольного амелогенина X показывает, что при анализе коротких ДНК-мишеней доля маркера Y-хромосомы определяется в 2 раза эффективнее, чем при помощи модифицированной системы праймеров для ПЦР-РВ. Средняя доля мужской сцДНК в тех же образцах составила $0,341 \pm 0,308$ против $0,150 \pm 0,177$, а парный t-тест Стьюдента показал статистически значимую разницу ($p < 0,001$).

На рис. 5 представлены результаты, полученные в группе беременных, среди которых были сотрудницы и пациентки ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ.

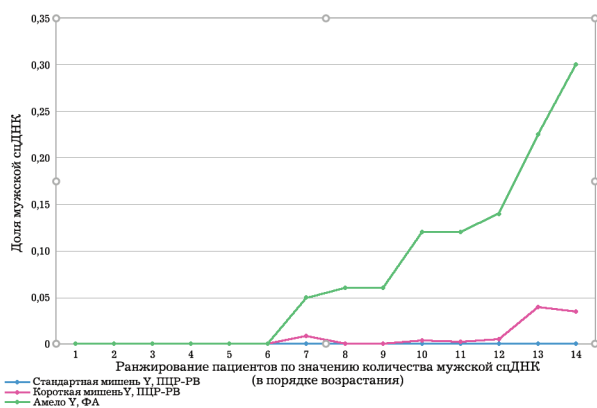


Рис. 5. Распределение относительного количества мужской сцДНК у беременных. ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени, сцДНК – свободная циркулирующая ДНК, амелоY – амелогенин Y-хромосомы, ФА – фрагментный анализ

Fig. 5. Distribution of male cfDNA relative amount in pregnant women. RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; cfDNA, free circulating DNA; ameloY, amelogenin of Y chromosome; FA, fragment analysis

По сравнению с данными описанных выше пациентов, перенесшими трансплантацию, доля мужской фсцДНК у беременных была значительно ниже. Кроме того, в этой группе было 4 случая, когда плод был женского пола, и 3 образца от женщин, ранее родивших мальчиков, что показано в табл. 3. Поэтому требования к чувствительности при оценке этих случаев были гораздо строже. При использовании стандартной тест-системы ПЦР-РВ ДНК-мишень Y-хромосомы не была обнаружена ни в одном образце. Однако с помощью модифицированной тест-системы она была обнаружена в 6 образцах на очень низком уровне. ФА короткого целевого амелогенина Y и референсного амелогенина X продемонстри-

ровали высокую чувствительность. Кроме того, фсцДНК мужского происхождения была обнаружена у всех пациенток, ожидающих мальчика, а у одной пациентки с множественной миеломой маркер амелогенина Y был неожиданно обнаружен повторно через 10 месяцев после кесарева сечения. Средняя доля сцДНК плода мужского пола не была обнаружена при тестировании ПЦР-РВ с немодифицированными праймерами и составила $0,007 \pm 0,013$ и $0,077 \pm 0,095$ при исследовании двумя другими методами. Парный t-тест Стьюдента показал значение 1,929, что говорит о том, что изменения признака не были статистически значимы при сравнении первых двух методов ($p = 0,076$), но оказались статистически значимыми при сравнении второго и третьего методов (значение t-теста = 2,834, $p = 0,014$).

Мы сделали две серии разведений образцов от двух пар здоровых доноров – мужчины и женщины – и протестировали Y-хромосомные маркеры аналогично анализу, проведенному на группах пациентов, описанных выше. Электрофореграммы фрагментного анализа ПЦР-продуктов и кривые амплификации целевой ДНК в ПЦР-РВ в серийных разведениях образцов представлены на рис 6.

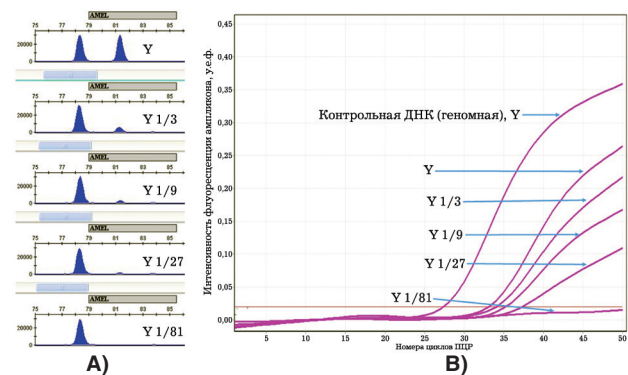


Рис. 6. Примеры данных фрагментного анализа (А) и ПЦР-РВ (В) для серийных разведений мужской сцДНК в женской сцДНК (по маркерам Y-хромосомы, разведения 1/3, 1/9, 1/27 и 1/81). у.е.ф. – условные единицы флуоресценции

Fig. 6. Examples of fragment analysis data (A) and RT-PCR data (B) for sequential dilutions of male cfDNA into female cfDNA (according to Y-chromosome markers, dilutions of 1/3, 1/9, 1/27, and 1/81). c.u.f. – conventional units of fluorescence

Для одной пары также удалось рассчитать долю мужской сцДНК с помощью STR-маркера D2S441. На рис. 7А результаты, полученные для данного маркера, представлены кривой сиреневого цвета. Этот гетерозиготный локус имеет несов-

падающие аллели у доноров, использованных для подготовки химерного образца. Длина целевой ДНК составляет от 90 до 100 п.н.

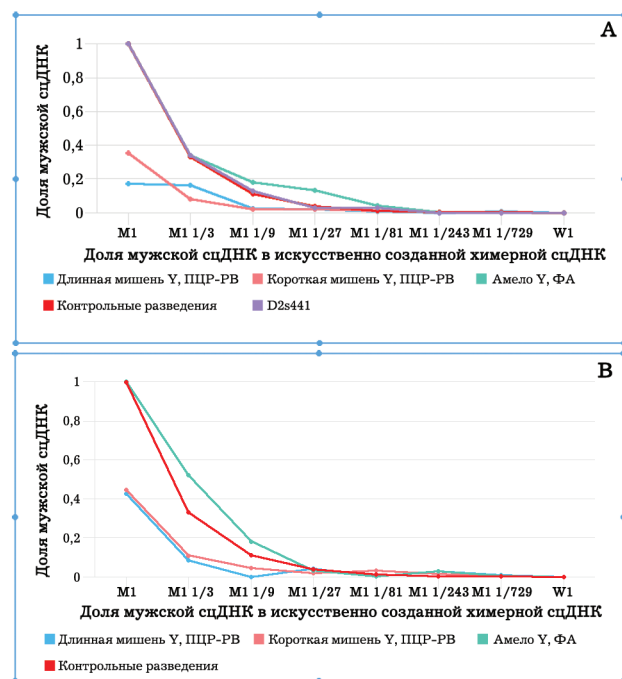


Рис. 7. Фракции мужской сцДНК в серии разведений от 1 до 1/729. А – донор 1, В – донор 2. Примечания: ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени, сцДНК – свободно циркулирующая ДНК, D2s441 – аллельный STR маркер, амелоY – амелогенин Y-хромосомы

Fig. 7. Fractions of male cfDNA in a dilution sequences from 1 to 1/729. A, donor 1; B, donor 2. RT-PCR, real-time polymerase chain reaction, cfDNA, free circulating DNA; D2s441, allelic STR marker, ameloY, amelogenin of Y chromosome

Как видно из рис. 7, мы получили достаточно высокую согласованность в изменении фракции мужской сцДНК при тестировании различными методами. Красные кривые представляют долю мужской сцДНК, рассчитанную по результатам разведения, а значения, полученные с помощью ФА коротких ДНК-мишеней, наиболее близки к красной кривой в обоих наборах разведений от двух пар здоровых доноров. Однако анализ более длинных ДНК-мишеней с помощью ПЦР позволяет выявить лишь около 20–40% реальной целевой фракции сцДНК.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что более короткая последовательность целевой ДНК имеет больше шансов на успешную

амплификацию из фрагментированной ДНК. Мы смогли продемонстрировать это количественно и оценить статистическую значимость полученных результатов с помощью простых моделей. На рис. 8 мы продемонстрировали возможные причины недостаточно эффективной амплификации ДНК-мишеней фрагментированной ДНК. В зависимости от места посадки праймеров на фрагменте амплификация может проходить с разной результативностью или не проходить вообще. В нашей работе при анализе длинных ДНК-мишеней эффективность амплификации была низкой и повышалась до 10 раз с уменьшением длины мишени.

В обзорной статье A.R. Thierry et al. [19] описывается возможный механизм фрагментации сцДНК. При апоптотическом расщеплении ДНК образуется характерный лестничный узор из фрагментов ДНК длиной 180–200 п.н. (большинство) или кратных им (олигонуклеосомы). Фрагментация ДНК происходит под действием активируемой каспазой ДНКазы в умирающих клетках и лизосомальной ДНКазы II после фагоцитоза умирающих клеток. Нуклеосома состоит из гистонового октамера и двухцепочечной ДНК, обернутой вокруг этого белкового комплекса, который стабилизируется гистонем H1. Каждая нуклеосома связана с другой двухцепочечной ДНК (линкером). Длина ДНК, обернутой вокруг гистонового октамера, составляет примерно 147 п.н., а длина линкерного участка – от 20 до 90 п.н. Эти фрагменты связаны между собой для обеспечения структурной целостности нуклеосомы, и защищают ДНК от ферментативной деградации в кровеносной системе. Стандартный размер сцДНК, таким образом, составляет от 160 до 180 п.н. На основании этих данных можно оценить эффективность амплификации целевой ДНК различной длины в зависимости от вероятного положения праймера на фрагменте сцДНК (рис. 8).

Поэтому для определения доли целевого фрагмента сцДНК важно понимать применимость метода и оптимальный размер ДНК-мишени. Из-за случайного характера фрагментации сцДНК бывает сложно предсказать эффективность праймеров для амплификации ДНК, но более короткие мишени имеют больше шансов на успешную амплификацию.

Современные функциональные тесты печени не обладают достаточной специфичностью и чувствительностью для эффективной диагностики большинства патологий аллотрансплантата, включая острое отторжение (ОО). «Золотым»

диагностическим стандартом остается биопсия трансплантата в случае его дисфункции. В исследовании E. Fernández-Galán et al. [20] оценивалась возможность измерения дсцДНК в качестве биомаркера ОО (так называемая жидкостная биопсия). Общая концентрация и размер фрагментов сцДНК, а также процентное содержание дсцДНК отслеживались в плазме крови 20 пациентов без отторжения и 7 пациентов – с Т-клеточно-опосредованным ОО в течение первых 3 месяцев после трансплантации печени. Средний процент дсцДНК был в 3 раза выше у пациентов до диагностики ОО и умеренно выше при подтвержденном диагнозе ОО по сравнению с таковым у пациентов без последующего или диагностированного отторжения. Доля фрагментов сцДНК размером 100–250 п.н. была выше при диагностике ОО по сравнению с пациентами без отторжения (68,0 против 57,9%, $p=0,02$). STR-ПЦР может быть альтернативной стратегией для быстрого количественного определения дсцДНК, которую легко реализовать в клинических лабораториях. Результаты этого пилотного исследования показывают, что уровень дсцДНК повышается очень рано, даже за 1–2 недели до постановки диагноза ОО, и поэтому он может быть полезен в качестве прогностического биомаркера для улучшения стратификации риска пациентов. Аналогичные результаты были получены для педиатрических пациентов после трансплантации печени [21]. В обзорной статье H. Andrikovics et al. [22] подчеркивается, что значительная положительная роль плазменной дсцДНК как биомаркера повреждения аллотрансплантата была обнаружена при трансплантации любого органа.

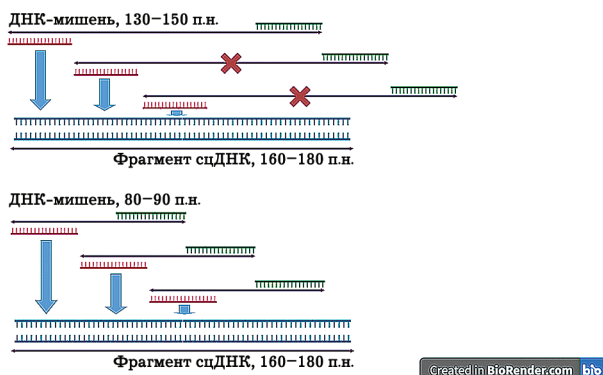


Рис. 8. Размер целевой ДНК и вероятные позиции праймеров для сцДНК. Синие стрелки – успешный отжиг праймеров; крестики – неудача амплификации

Fig. 8. Size of target DNA and probable primer positions for cfDNA. Blue arrows designate successful primer annealing; crosses demonstrate amplification failure

В то же время клиническое значение тестирования химеризма плазменной сцДНК при алло-ТГСК менее изучено. Однако при выявлении рецидивов у больных лейкозом с полным донорским химеризмом в клетках периферической крови и костного мозга было установлено, что методика определения сцДНК плазмы более чувствительна, чем определение клеточного химеризма [5]. Дальнейшее исследование показало, что смешанный химеризм обнаруживается в сцДНК в большем проценте образцов, чем в клетках периферической крови после алло-ТГСК. Интересно, что анализ микрохимеризма на основе плазменной сцДНК позволял выявить изолированные экстрамедуллярные рецидивы, когда в клетках периферической крови наблюдался полный донорский химеризм [23]. Концентрация сцДНК у реципиента повышается не только при рецидивах, но и при осложнениях, связанных с трансплантацией, особенно при острой реакции трансплантата против хозяина (ОРТПХ). Уменьшение выраженности симптомов ОРТПХ в процессе терапии совпадало со снижением уровня фракции реципиентной сцДНК, а стабилизация или усиление ОРТПХ, напротив, ассоциировались со стабильным или повышенным уровнем реципиентной сцДНК. Эта ассоциация позволяет предположить, что разрушение клеток реципиента в органах-мишенях при ОРТПХ может быть источником сцДНК. Не было обнаружено корреляции между долей реципиентной сцДНК и тяжестью ОРТПХ (I–II класс по сравнению с III–IV классом). Хроническая РТПХ не была связана со смешанным химеризмом в сцДНК у пациентов.

M. Waterhouse et al. [24] сообщили о клинической пользе мониторинга минимальной остаточной болезни и смешанного химеризма в сцДНК с помощью капельно-цифровой ПЦР для 62 пациентов с миелоидными злокачественными опухолями, получивших алло-ТГСК. Пороговое значение химеризма в сцДНК, равное 18%, позволило отличить пациентов с гематологическими рецидивами от пациентов в полной ремиссии после алло-ТГСК. Большинство мутаций, выявленных с помощью целевой NGS-панели, были обнаружены в сцДНК во время рецидива и подходили для мониторинга минимальной остаточной болезни. В нескольких случаях мутации были обнаружены в сцДНК раньше, чем в моноклеарных клетках периферической крови. Опубликован ряд исследований, направленных на анализ опухолевых маркеров в сцДНК при онкогематологических заболеваниях и солидных опухолях [25–

30]. Возможно, коррекция длины целевой ДНК изменит количественные характеристики тестов в сторону более точной оценки маркеров сцДНК.

Было установлено, что фрагменты ДНК в плазме крови беременных значительно длиннее, чем в плазме крови небеременных женщин. Кроме того, было показано, что молекулы сцДНК материнского происхождения длиннее, чем молекулы фетальной сцДНК (фсцДНК) плода. К.С.А. Chan et al. обнаружили, что доля фрагментов сцДНК размером более 201 п.н. в плазме крови составляла 57% у беременных женщин и 14% – у небеременных женщин. Доля фрагментов фсцДНК размером более 193 и более 313 п.н. в материнской плазме составила 20 и 0% соответственно [31]. Ретроспективное когортное исследование 27 793 женщин с одноплодной беременностью, проведенное Y. Hou et al., было направлено на выявление анеуплоидий половых хромосом и трисомий 18-й, 13-й и 21-й хромосом. Было отмечено, что уровень фетальной фракции сцДНК (ФФ) в подгруппах T18 и T13 был значительно ниже, чем в группе без трисомии, в то время как ФФ в группе T21 он был значительно выше, чем в группе без трисомии. Корреляционный анализ Пирсона выявил положительную корреляцию между содержанием ФФ и длительностью беременности в группах риска [32]. Таким образом, важность максимально корректного определения доли ФФ становится очевидной. Обнаружение фсцДНК в материнской плазме ускорило развитие метода НИПТ. В настоящее время этот метод доступен во всем мире и является высокоточным для выявления хромосомной анеуплоидии плода. Более 6 миллионов беременных прошли эту процедуру для выявления анеуплоидии плода. С момента появления НИПТ несколькими научными комитетами по всему миру были опубликованы и обновлены руководства и рекомендации, направленные на поддержку клинического использования НИПТ у беременных [33]. С 2011 года НИПТ используется в коммерческих целях для выявления хромосомных анеуплоидий. Несколько клинических исследований показали, что уровень ФФ является важным параметром для НИПТ. Y.-S. Lu et al. провели масштабный ретроспективный анализ эффективности НИПТ [34]. Беременные (n=282 911), участвовавшие в бесплатной НИПТ (апрель 2018 – декабрь 2021 г.), были обследованы на наличие распространенных трисомий. Эффективность НИПТ оценивалась по положительной прогностической ценности, чувствительности и специфичности.

При секвенировании ДНК методом ионного полупроводникового секвенирования, при котором ДНК фрагментируют, затем к концам полученных фрагментов лигируют специфические ДНК-адаптеры, необходимые для эмульсионной ПЦР на магнитных сферах и последующего секвенирования, средняя длина фрагментов, используемых для создания библиотеки, составляла около 135–145 п.н., а длина прочтений – около 200 п.н. Было выявлено 7 (1%) ложноотрицательных случаев.

Н.-J. Kwon et al. [35] провели парное секвенирование для определения диапазона размеров фетальной и материнской сцДНК у 62 374 беременных женщин. По результатам секвенирования предложен критерий, определяющий фетальную сцДНК как менее 150 п.н., а материнскую сцДНК – как более 180 п.н. Благодаря внедрению критерия выбора размера была повышена точность НИПТ, что привело к увеличению общей положительной прогностической ценности для всех анеуплоидий от 89,57 до 97,10%. Это было достигнуто за счет обогащения как фетальной, так и материнской сцДНК, что увеличило долю фетальной сцДНК, а количество ложноположительных результатов для всех анеуплоидий было снижено более чем на 70%. Е. Шубиной и соавторами разработан подход к оценке ФФ независимо от пола плода с помощью высокопроизводительного секвенирования набора частотных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Для каждого из полиморфизмов, анализируемых в системе, были подобраны специфические праймеры для амплификации целевого фрагмента. Праймеры были сконструированы таким образом, чтобы длина продукта ПЦР не превышала 110 п.н. [36].

Заключение

Размер целевой ДНК оказывает значительное влияние на точность измерений доли сцДНК (донорской, фетальной и т.д.). Уменьшение длины ДНК-мишени до 84 пар нуклеотидов приводит к более эффективной детекции целевой свободной циркулирующей ДНК с увеличением ее доли в тотальной свободной циркулирующей ДНК до 10 раз ($p < 0,05$, статистически значимо) как у пациентов после трансплантации печени, так и у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, а также позволяет выявить фсцДНК с низкой концентрацией. В случаях, когда в образце предполагается значительная доля целевой свободной циркулирующей ДНК, можно использовать стандартные

методы анализа геномной ДНК, но при этом могут потребоваться поправки на снижение чувствительности метода.

Выводы

1. У пациентов после трансплантации печени средняя доля мужской сцДНК составила $0,035 \pm 0,079$, $0,096 \pm 0,150$ ($p=0,009$, статистически значимо) и $0,350 \pm 0,388$ ($p=0,001$, статистически значимо) при использовании трех разных тест-систем для ПЦР-анализа.

2. В группе пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток средняя доля мужской сцДНК составила $0,032 \pm 0,043$, $0,150 \pm 0,177$ ($p=0,005$, статистически значимо) и $0,341 \pm 0,308$ ($p<0,001$, статистически значимо).

3. В группе беременных при использовании стандартной системы праймеров для ПЦР-РВ маркеры Y-хромосомы не были выявлены, при использовании модифицированной системы для ПЦР-РВ и системы праймеров к коротким ДНК-мишеням для ПЦР с фрагментным анализом средняя доля мужской сцДНК составила $0,007 \pm 0,013$ ($p=0,076$, статистически значимо) и $0,077 \pm 0,095$ ($p=0,014$, статистически значимо) соответственно.

4. При анализе искусственных химер с известной долей мужской сцДНК значения, полученные с помощью фрагментного анализа коротких ДНК-мишеней, оказались наиболее близкими к действительным. Анализ более длинных ДНК-мишеней с помощью ПЦР-РВ позволил выявить лишь около 20–40% целевой фракции сцДНК.

Список литературы/References

- Levitsky J, Kandpal M, Guo K, Klei-boeker S, Sinha R, Abecassis M, et al. Donor-derived cell-free DNA levels predict graft injury in liver transplant recipients. *Am J Transplant*. 2022;22(2):532–540. PMID: 34510731 <https://doi.org/10.1111/ajt.16835>
- Avramidou E, Vasileiadou S, Antoniadis N. Liver transplantation and dd-cfDNA: a small solution for a big problem. *Livers*. 2023;3(1):76–81. <https://doi.org/10.3390/livers3010007>
- García-Fernández N, Macher HC, Suárez-Artacho G, Gómez-Bravo MÁ, Molinero P, Guerrero JM, et al. Donor-Specific Cell-Free DNA qPCR quantification as a noninvasive accurate biomarker for early rejection detection in liver transplantation. *J Clin Med*. 2022;12(1):36. PMID: 36614837 <https://doi.org/10.3390/jcm12010036>
- Cheng AP, Cheng MP, Loy CJ, Lenz JS, Chen K, Smalling S, et al. Cell-free DNA profiling informs all major complications of hematopoietic cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022;119(4):e2113476118. PMID: 35058359 <https://doi.org/10.1073/pnas.2113476118>
- Aljurf M, Abalkhail H, Alseraihy A, Mohamed SY, Ayas M, Alsharif F, et al. Chimerism analysis of cell-free DNA in patients treated with hematopoietic stem cell transplantation may predict early relapse in patients with hematologic malignancies. *Biotechnol Res Int*. 2016;2016:8589270. PMID: 27006832 <https://doi.org/10.1155/2016/8589270>
- Pasca S, Guo MZ, Wang S, Stokvis K, Shedeck A, Pallavajjala A, et al. Cell-free DNA measurable residual disease as a predictor of postallogeic hematopoietic cell transplant outcomes. *Blood Adv*. 2023;7(16):4660–4670. PMID: 37276081 <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023010416>
- Gardner McKinlay RJM, Sutherland GR, Shaffer LG, eds. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. Oxford University Press Inc.; 2011.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350(9076):485–487. PMID: 9274585 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0)
- Казаков В.И., Божков В.М., Линде В.А., Репина М.А., Михайлов В.М. Внеклеточная ДНК в крови беременных женщин. *Цитология*. 1995;37(3):232–236. Kazakov VI, Bozhkov VM, Linde VA, Repina MA, Mikhailov VM. Extracellular DNA in the blood of pregnant women. *Cytology*. 1995;37(3):232–236. (In Russ.).
- Jeon YJ, Zhou Y, Li Y, Guo Q, Chen J, Quan S, et al. The feasibility study of non-invasive fetal trisomy 18 and 21 detection with semiconductor sequencing platform. *PLoS One*. 2014;9(10):e110240. PMID: 25329639 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110240>
- Thung DT, Beulen L, Hehir-Kwa J, Faas BH. Implementation of whole genome massively parallel sequencing for noninvasive prenatal testing in laboratories. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(1):111–124. PMID: 25347354 <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.973857>
- Grunt M, Hillebrand T, Schwarzenbach H. Clinical relevance of size selection of circulating DNA. *Transl Cancer Res*. 2018;7(Suppl 2):S171–84. <https://doi.org/10.21037/tcr.2017.10.10>
- Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating DNA as biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):e136. PMID: 26453190 <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0645-5>
- Page K, Hava N, Ward B, Brown J, Guttery DS, Ruangpratheep C, et al. Detection of HER2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Br J Cancer*. 2011;104(8):1342–1348. PMID: 21427727 <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.89>
- Page K, Powles T, Slade MJ, Tamburo De Bella M, Walker RA, Coombes RC, et al. The importance of careful blood processing in isolation of cell-free DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1075:313–317. PMID: 17108226 <https://doi.org/10.1196/annals.1368.042>

16. Trigg RM, Martinson LJ, Parpart-Li S, Shaw JA. Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: a systematic review of the methodology literature. *Heliyon*. 2018;4(7):e00699. PMID: 30094369 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00699>
17. Barton DE. DNA prep for eukaryotic cells (macrophages)? 1995. Available at: <http://www.bio.net/bionet/mm/methods-and-reagents/1995-July/031231.html> [Accessed August 6, 2024].
18. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*. 2002;99(12):4618–4625. PMID: 12036896 <https://doi.org/10.1182/blood.V99.12.4618>
19. Thierry AR, Messaoudi SEI, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(3):347–376. PMID: 27392603 <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9629-x>
20. Fernández-Galán E, Badenas C, Fond-evila C, Jiménez W, Navasa M, Puig-Butillé JA, et al. Monitoring of donor-derived cell-free DNA by short tandem repeats: concentration of total cell-free DNA and fragment size for acute rejection risk assessment in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2022;28(2):257–268. PMID: 34407295 <https://doi.org/10.1002/lt.26272>
21. Zhao D, Zhou T, Luo Y, Wu C, Xu D, Zhong C, et al. Preliminary clinical experience applying donor-derived cell-free DNA to discern rejection in pediatric liver transplant recipients. *Sci Rep*. 2021;11(1):1138. PMID: 33441886 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80845-6>
22. Andrikovics H, Örfi Z, Meggyesi N, Bors A, Varga L, Kövy P, et al. Current trends in applications of circulatory microchimerism detection in transplantation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4450. PMID: 31509957 <https://doi.org/10.3390/ijms20184450>
23. Duque-Afonso J, Waterhouse M, Pfeifer D, Follo M, Duyster J, Bertz H, et al. Cell-free DNA characteristics and chimerism analysis in patients after allogeneic cell transplantation. *Clin Biochem*. 2018;52:137–141. PMID: 29180242 <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.11.015>
24. Waterhouse M, Pennisi S, Pfeifer D, Scherer F, Zeiser R, Duyster J, et al. Monitoring of measurable residual disease using circulating DNA after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancers (Basel)*. 2022;14(14):3307. PMID: 35884368 <https://doi.org/10.3390/cancers14143307>
25. Смирнова С.Ю., Никулина Е.Е., Габеева Н.Г., Королева Д.А., Татарникова С.А., Смольянинова А.К. и др. Свободно циркулирующая ДНК в плазме у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности («Double hit»/«Triple hit»). *Клиническая онкогематология*. 2023;16(2):200–208. Smirnova SYu, Nikulina EE, Gabeeva NG, Koroleva DA, Tatarnikova SA, Smol'yaninova AK, et al. Plasma cell-free DNA in patients with diffuse large B-cell and B-cell high-grade («Double hit»/«Triple hit») lymphomas. *Clinical Oncohematology*. 2023;16(2):200–208. (In Russ.). <https://doi.org/10.21320/2500-2139-2023-16-2-200-208>
26. Soloveva M, Solovev M, Yakutik I, Biderman B, Nikulina E, Risinskaya N, et al. RAS-ERK pathway genes mutations in the lesions from various tumour loci in multiple myeloma. *EMJ Hematol*. 2023;11(1):35–36. <https://doi.org/10.33590/emjhematol/10305683>
27. Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H, Coelho A, Nogal A, Sousa A, et al. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA Cell Biol*. 2008;27(8):415–421. PMID: 18694299 <https://doi.org/10.1089/dna.2008.0744>
28. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, Papadopoulos N, Carpten JD, Craig D, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med*. 2012;4(162):162ra154. PMID: 23197571 <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004742>
29. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579–586. PMID: 24449238 <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011>
30. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Lusa L, Battaglia L, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2008;263(2):170–181. PMID: 18395974 <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.021>
31. Chan KCA, Zhang J, Hui ABY, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2004;50(1):88–92. PMID: 14709639 <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.024893>
32. Hou Y, Yang J, Deng F, Wang F, Peng H, Guo F, et al. Association between cell-free DNA fetal fraction and pregnant character: a retrospective cohort study of 27,793 maternal plasmas. *Sci Rep*. 2023;13(1):11420. PMID: 37452067 <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38151-4>
33. Benn P, Borrell A, Chiu RWK, Cuckle H, Dugoff L, Faas B, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn*. 2015;35(8):725–734. PMID: 25970088 <https://doi.org/10.1002/pd.4608>
34. Lu Y-S, Chen Y-Y, Ding S-Y, Zeng L, Shi L-C, Li Y-J, et al. Performance analysis of non-invasive prenatal testing for trisomy 13, 18, and 21: a large-scale retrospective study (2018–2021). *Heliyon*. 2024;10(13):e33437. PMID: 39040373 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33437>
35. Kwon H-J, Yun S, Joo J, Park D, Do W-J, Lee S, et al. Improving the accuracy of noninvasive prenatal testing through size-selection between fetal and maternal cfDNA. *Prenat Diagn*. 2023;43(13):1581–1592. PMID: 37975672 <https://doi.org/10.1002/pd.6464>
36. Шубина Е., Янкевич Т., Гольцов А.Ю., Мукосей И.С., Кочеткова Т.О., Быстрицкий А.А. и др. Определение доли плодовой ДНК в плазме крови беременной женщины с помощью высокопроизводительного секвенирования набора частотных однонуклеотидных полиморфизмов. *Вестник российского государственного медицинского университета*. 2018;7(3):30–34. Shubina J, Jankevich T, Goltsov Yu, Mukosey IS, Kochetkova TO, Bystritsky AA, et al. Quantification of fetal DNA in the plasma of pregnant women using next generation sequencing of frequent single nucleotide polymorphisms. *Bulletin of RSMU*. 2018;7(3):29–33. (In Russ.). <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.031>

Информация об авторах

Елена Евгеньевна Никулина	научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, https://orcid.org/0000-0003-3914-8611 , lenysh2007@rambler.ru 25% – разработка концепции и дизайна исследования, сбор и анализ данных, подготовка рукописи к печати, проведение исследования в соответствии с его дизайном, взаимодействие с редакцией
Наталья Владимировна Рисинская	канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, https://orcid.org/0000-0003-2957-1619 , risinska@gmail.com 25% – разработка концепции и дизайна исследования, сбор и анализ данных, подготовка рукописи к печати, проведение исследования в соответствии с его дизайном, взаимодействие с РНФ
Ольга Евгеньевна Дубова	стажер лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ; стажер-исследователь Института цифрового биодизайна и моделирования живых систем ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), https://orcid.org/0009-0005-1903-6200 , dubovaolgaa@gmail.com 7% – проведение исследования в соответствии с его дизайном, подготовка образцов и данных для анализа
Ольга Васильевна Сумцова	врач-гепатолог, научный сотрудник отдела трансплантологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, https://orcid.org/0000-0003-3440-6685 , olga.vasina.do4@gmail.com 6% – взаимодействие с пациентами, сбор образцов в соответствии с дизайном исследования, редактирование рукописи
Ян Геннадьевич Мойсюк	проф., д-р мед. наук, руководитель отдела трансплантологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, https://orcid.org/0000-0002-0002-9183 , moysyuktrans@list.ru 6% – редактирование рукописи
Вера Алексеевна Васильева	канд. мед. наук, заведующая отделением «Дневной стационар иммунохимиотерапии после трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток» ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, https://orcid.org/0000-0003-1739-1063 , vasilievava4@mail.ru 5% – сбор образцов в соответствии с дизайном исследования
Майя Валерьевна Соловьева	канд. мед. наук, старший научный сотрудник отделения интенсивной высокодозной химиотерапии парапротеинемических гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, https://orcid.org/0000-0003-4142-171X , firs-maia@yandex.ru 5% – сбор образцов в соответствии с дизайном исследования
Анна Александровна Юшкова	ведущий специалист лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, https://orcid.org/0000-0002-0364-3242 , ann.unikova@bmk.ru 5% – подготовка образцов для исследования и данных для анализа
Ирина Серафимовна Февралева	канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, https://orcid.org/0000-0002-8763-246X , irina_fevraleva@mail.ru 4% – подготовка образцов для исследования и данных для анализа
Анастасия Сергеевна Скрипкина	стажер лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ; стажер-исследователь Института цифрового биодизайна и моделирования живых систем ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), https://orcid.org/0009-0009-1333-9437 , stasia_a0@mail.ru 4% – подготовка образцов для исследования и данных для анализа
Алина Артуровна Макарик	врач-ординатор отделения патологии беременности ГБУЗ МОНИАГ им. В.И. Краснопольского, https://orcid.org/0000-0002-4281-5051 , alinamakarik@mail.ru 4% – подготовка образцов для исследования и данных для анализа
Андрей Борисович Судариков	д-р биол. наук, заведующий отделом молекулярной генетики, заведующий лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, https://orcid.org/0000-0001-9463-9187 , dusha@blood.ru 4% – редактирование рукописи

Information about the authors

Elena E. Nikulina	Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology, https://orcid.org/0000-0003-3914-8611 , lenysh2007@rambler.ru 25%, development of the concept and design of the study, data collection and analysis, preparation of the manuscript for publication, conducting the study in accordance with its design, interaction with the editorial board
Natalia V. Risinskaya	Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology, https://orcid.org/0000-0003-2957-1619 , risinska@gmail.com 25%, development of the concept and design of the study, data collection and analysis, preparation of the manuscript for publication, conducting the study in accordance with its design, interaction with the Russian Science Foundation
Olga E. Dubova	Researcher Assistant, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology; Research Assistant, Institute of Digital Biodesign and Simulation of Living Systems, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), https://orcid.org/0009-0005-1903-6200 , dubovaolgaa@gmail.com 7%, conducting the study in accordance with its design, preparing samples and collecting the data for analysis
Olga V. Sumtsova	Hepatologist, Researcher, Department of Transplantology, Moscow Regional Research and Clinical Institute n.a. M.F. Vladimirskiy, https://orcid.org/0000-0003-3440-6685 , olga.vasina.do4@gmail.com 6%, interaction with patients, collecting samples in accordance with the study design, editing the manuscript
Yan G. Moysyuk	Prof., Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Transplantology, Moscow Regional Research and Clinical Institute n.a. M.F. Vladimirskiy, https://orcid.org/0000-0002-0002-9183 , moysyuktrans@list.ru 6%, editing the manuscript
Vera A. Vasilieva	Cand. Sci. (Med.), Head of the Department "Daytime Hospital for Immunochemotherapy after Transplantation of Bone Marrow and Hematopoietic Stem Cells", National Medical Research Center for Hematology, https://orcid.org/0000-0003-1739-1063 , vasilievava4@mail.ru 5%, collecting samples in accordance with the study design
Maya V. Soloveva	Cand. Sci. (Med.), Hematologist, Department of Intensive High-Dose Chemotherapy for Paraproteinemic Hemoblastoses, National Medical Research Center for Hematology, https://orcid.org/0000-0003-4142-171X , firs-maia@yandex.ru 5%, collecting samples in accordance with the study design
Anna A. Yushkova	Leading Specialist, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology, https://orcid.org/0000-0002-0364-3242 , ann.unikova@bk.ru 5%, preparation of samples for the study and data for analysis
Irina S. Fevrалева	Senior Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology, https://orcid.org/0000-0002-8763-246X , irina_fevraleva@mail.ru 4%, preparation of samples for the study and data for analysis
Anastasiya S. Skripkina	Trainee in Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology; Research Assistant, Institute of Digital Biodesign and Simulation of Living Systems, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), https://orcid.org/0009-0009-1333-9437 , stasia_a0@mail.ru 4%, preparation of samples for the study and data for analysis
Alina A. Makarik	Residency-training Physician, Department of Pregnancy Pathology, Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology named after Academician V.I. Krasnopolsky, https://orcid.org/0000-0002-4281-5051 , alinamakarik@mail.ru 4%, preparation of samples for the study and data for analysis
Andrey B. Sudarikov	Dr. Sci. (Biol.), Head of the Department of Molecular Genetics, Head of the Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology, https://orcid.org/0000-0001-9463-9187 , dusha@blood.ru 4%, manuscript editing

Статья поступила в редакцию 03.09.2024;
одобрена после рецензирования 17.09.2024;
принята к публикации 18.09.2024

The article was received on September 3, 2024;
approved after reviewing on September 17, 2024;
accepted for publication on September 18, 2024