

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ НІА-ТИПУВАННЯ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ
ВТРАТИ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТІ ПРИ РЕЦИДИВАХ
ОНКОГЕМАТОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Дробнової Дар’ї Олегівни

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доц. Юет А.С.

Робота виконана у відділі тканинного типування лабораторії медичної генетики ДНП «НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України» під керівництвом зав. відділу, генетика, канд. біол. наук Мазанової Анни Олександрівни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМЛ	– гостра мієлоїдна лейкемія;
ТГСК	– трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин;
aUPD	– acquired uniparental disomy (набута унібатьківська дисомія);
CLIP	– class II-associated invariant chain peptide (пептид інваріантного ланцюга класу II);
CL-LOH	– copy-loss loss of heterozygosity (втрата гетерозиготності з втратою копії);
CN-LOH	– copy-neutral loss of heterozygosity (копійно-нейтральна втрата гетерозиготності);
ddNTP	– dideoxynucleoside triphosphates (дидезоксинуклеозидтрифосфати);
ERAP1, 2	– endoplasmic reticulum aminopeptidase (амінопептидази ендоплазматичного ретикулуму);
ERp57	– endoplasmic reticulum protein 57 (ендоплазматичний білок 57);
GvL	– Graft versus Leukemia («трансплантат проти лейкемії»);
GvHD	– Graft versus Host Disease («трансплантат проти хазяїна»);
HLA	– human leukocyte antigen (людський лейкоцитарний антиген);
LOH	– loss of heterozygosity (втрата гетерозиготності);
MHC	– major histocompatibility complex (головний комплекс гістосумісності);
NGS	– next-generation sequencing (секвенування нового покоління);

- PBS – phosphate-buffered saline (фосфатний забуферений розчин);
- PD-1 – programmed cell death protein 1 (білок запрограмованої клітинної смерті);
- PD-L1 – programmed death-ligand 1 (ліганд білка запрограмованої смерті 1);
- PLC – peptide-loading complex (комплекс завантаження пептидів);
- SBT – sequencing-based typing (типування, що базується на послідовності, типування за Сенгером);
- SSP – sequence-specific primers (праймери, специфічні до послідовності);
- TAP – transporter associated with antigen processing (транспортер, асоційований з процесингом антигену);
- TCR – T-cell receptor (Т-клітинний рецептор).

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Структурно-функціональна характеристика комплексу лейкоцитарних антигенів людини	8
1.1 Організація структури протеїнів системи лейкоцитарних антигенів людини	8
1.2. Клітинно-молекулярні механізми обробки антигенів та їх презентації системою HLA	10
1.3. Вплив системи HLA на процеси імунного контролю та механізми розвитку онкогематологічних захворювань	11
1.4. Алогенна трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин та її вплив на імуногенетичні механізми рецидивів	14
1.5. Роль втрати гетерозиготності за локусами лейкоцитарних антигенів людини у перебігу рецидивів онкогематологічних захворювань	17
1.5.1. Молекулярно-генетичні механізми формування втрати гетерозиготності	17
1.5.2. Клональні порушення та еволюція бластних клітин як передумова виникнення рецидиву	19
1.5.3. Втрата гетерозиготності як фактор прогнозу та терапевтичного планування при рецидивах онкогематологічних захворювань	22
1.6. Молекулярно-генетичні методи, які використовуються для детекції втрати гетерозиготності за локусами HLA у сучасній лабораторній практиці	24
1.6.1. HLA-типсування із застосуванням праймерів, специфічних до послідовності (Sequence-specific primers, SSP) для оцінки алельного складу генів HLA	24
1.6.2. Секвенування за Сенгером як золотий підхід для молекулярного визначення HLA-генів	25

1.6.3. Секвенування нового покоління (NGS) для аналізу генетичної структури HLA-генів	26
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	29
2.1. Обладнання та реагенти	29
2.2. Методи досліджень.....	31
2.2.1. Екстракція ДНК з периферичної крові.....	31
2.2.2. Визначення послідовності генів людського лейкоцитарного антигену з використанням специфічних праймерів (SSP)	32
2.2.3. Секвенування генів людського лейкоцитарного антигену за Сенгером.....	35
2.2.4. Визначення генетичної послідовності лейкоцитарного антигену людини за допомогою секвенування нового покоління (NGS).....	38
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....	46
3.1. Втрата гетерозиготності в генах людського лейкоцитарного антигену у пацієнта з рецидивом гострого мієлоїдного лейкозу після алогенної ТГСК.....	47
3.2. Методологічні підходи до детекції трьох алелей генів HLA у пацієнтів після алогенної ТГСК.....	57
3.3. Дотрансплантаційна втрата одного з батьківських HLA-гаплотипів при рецидиві гострого лімфобластного лейкозу.....	65
3.4. Переваги методу низької роздільної здатності при виявленні втрати гетерозиготності за генами HLA.....	68
ВИСНОВКИ.....	70
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	71

ВСТУП

Людський лейкоцитарний антиген (Human Leukocyte Antigen, HLA) є надзвичайно поліморфною системою протеїнів, що кодується генами головного комплексу гістосумісності (МНС) і відіграє фундаментальну роль у розпізнаванні антигенів та регуляції імунної відповіді. Визначення генетичних варіантів генів системи HLA проводиться під час підготовки до трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин, а найвищий ступінь генетичної сумісності між реципієнтом та донором є критично важливим для успіху процедури та, з одного боку, дозволяє мінімізувати ризики розвитку реакції «трансплантат проти хазяїна» (Graft versus Host Disease, GvHD), з іншого – посилює реакцію «трансплантат проти лейкемії» (Graft versus Leukemia, GvL) [1].

В той же час, одним із специфічних механізмів імунного маскування злоякісних клітин, зокрема в посттрансплантаційний період, є втрата гетерозиготності (Loss of Heterozygosity, LOH) у локусах HLA. Цей процес призводить до того, що донорські алелі HLA не експресуються, внаслідок чого пухлина стає непомітною для імунної системи трансплантата, що нівелює ефект GvL [2].

Попри теоретичну обґрунтованість явища втрати гетерозиготності у системі HLA, у клінічній практиці воно часто залишається поза увагою. Враховуючи, що дослідження динаміки змін HLA у пацієнтів з онкогематологічними рецидивами є рідкісними, порівняльна оцінка методів їх детекції є актуальним завданням для сучасної молекулярно-генетичної діагностики. Пошук оптимального методу для виявлення явища втрати гетерозиготності є критично важливим для подальшого успіху обрання стратегії терапії для пацієнтів з рецидивами основного онкогематологічного захворювання [3, 4].

З огляду на вищезазначене, метою роботи було порівняти методи HLA-типуювання для детекції втрати гетерозиготності при рецидивах онкогематологічних захворювань.

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

1. Провести молекулярно-генетичне типування людського лейкоцитарного антигену (HLA) пацієнтів із рецидивом основного гематологічного захворювання із застосуванням методів різної роздільної здатності (SSP, SBT, NGS).
2. Порівняти аналітичну чутливість молекулярно-генетичних методів визначення генів HLA для детекції втрати гетерозиготності.
3. Проаналізувати можливі обмеження використаних методів, зокрема при виявленні втрати гетерозиготності.

РОЗДІЛ 1

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСУ ЛЕЙКОЦИТАРНИХ АНТИГЕНІВ ЛЮДИНИ

1.1. Організація структури протеїнів системи лейкоцитарних антигенів людини

Система лейкоцитарного антигену людини (Human Leukocyte Antigen, HLA) є аналогом головного комплексу гістосумісності (Major Histocompatibility Complex, MHC) та представлена набором протеїнів, які беруть участь у регуляції імунної відповіді шляхом розпізнавання «свій-чужий» [1, 5]. Гени, що кодують ці протеїни, локалізовані на короткому плечі шостої хромосоми (6p21.3) та характеризуються надзвичайно високим рівнем поліморфізму, що забезпечує індивідуальні особливості розвитку імунної відповіді у кожної людини [6].

Система HLA поділяється на два основні класи залежно від структури, функціональних особливостей і рівня експресії молекул на поверхні клітин. До HLA I класу належать локуси HLA-A, HLA-B, HLA-C, продукти яких експресуються на всіх ядерних клітинах, а розпізнавання відбувається за участі CD8⁺ цитотоксичних Т-клітин. Їхнє функціональне значення полягає в зв'язуванні та презентації внутрішньоклітинних антигенів – пептидів пухлини чи вірусних частинок [1]. Порівняно з HLA I класу, молекули II класу представлені HLA-DR, HLA-DQ і HLA-DP, експресія яких є більш специфічною, адже поширена переважно на антигенпрезентуючих клітинах, таких як В-лімфоцити, дендритні клітини та клітини моноцитно-макрофагальної лінії. Їхнє розпізнавання опосередковане CD4⁺ хелперними Т-клітинами, забезпечуючи презентацію антигенів позаклітинного походження [5].

Молекули HLA I класу є мембранозв'язаними глікопротеїнами з гетеродимерною організацією, представленою важким глікозильованим поліпептидним α -ланцюгом з молекулярною масою 45 кДа, нековалентно асоційованим з позаклітинним легким $\beta 2$ -мікроглобуліном масою близько 12 кДа, що стабілізує протеїн [6]. Важкий α -ланцюг включає три позаклітинні домени – $\alpha 1$, $\alpha 2$ та $\alpha 3$, трансмембранну ділянку (ТМ) і цитоплазматичний хвіст на С-кінці. Домени $\alpha 1$ і $\alpha 2$ формують високополіморфну пептид-зв'язувальну борозенку для розпізнавання антигенів, а домен $\alpha 3$ є головним сайтом взаємодії CD8+ Т-клітинного рецептора [1, 5, 7]. Молекули HLA II класу також мають гетеродимерну структуру, де кожен з нековалентно зв'язаних ланцюгів α (30-35 кДа) та β (26-29 кДа), складається з двох позаклітинних доменів – $\alpha 1$, $\alpha 2$ та $\beta 1$, $\beta 2$ відповідно [5]. Пептид-зв'язувальна борозенка сформована дистальними доменами $\alpha 1$ і $\beta 1$, тоді як проксимальні $\alpha 2$ і $\beta 2$ беруть участь у зв'язуванні з CD4+ Т-клітинним рецептором (рис. 1.1) [1, 7].

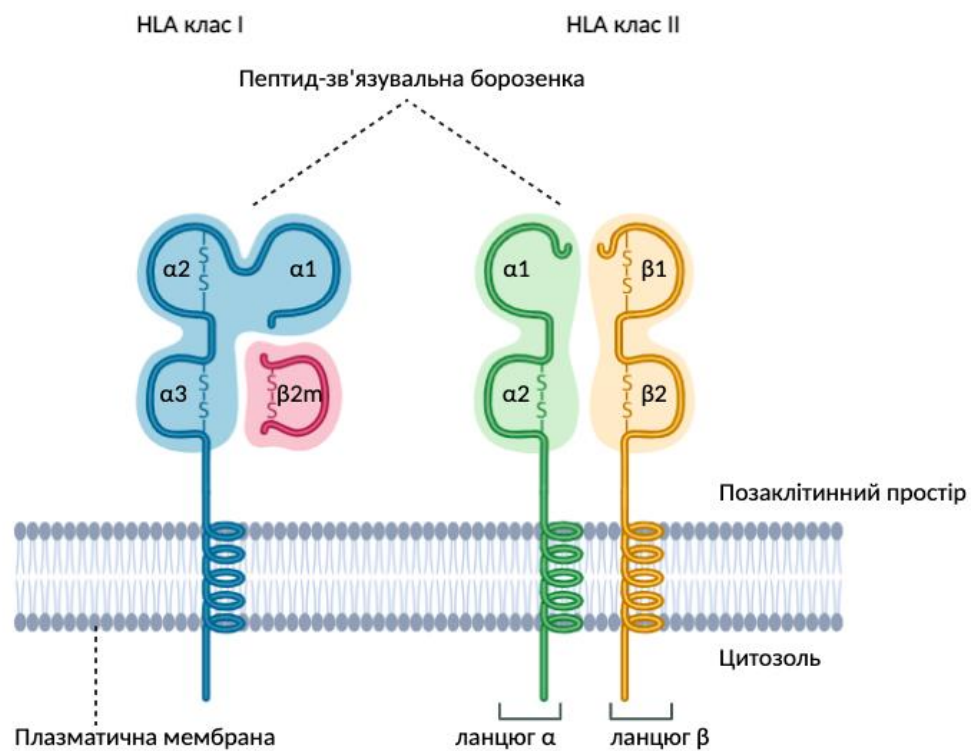


Рис. 1.1. Будова протеїнів HLA I та II класів. Запозичено з [6]

1.2. Клітинно-молекулярні механізми обробки антигенів та їх презентації системою HLA

Обробка і презентація антигенів системою лейкоцитарного антигену людини є сукупністю внутрішньоклітинних етапів деградації і завантаження пептидів в борозенку молекули HLA. Ці процеси лежать в основі функціонування адаптивного імунітету, забезпечуючи розпізнавання ендогенних і екзогенних антигенів Т-клітинами та визначаючи ефективність імунного контролю [6].

Молекули HLA класу I презентують внутрішньоклітинні або ендогенні антигени. Спочатку пептиди, утворені внаслідок протеасомної деградації, маркуються убіквітиновими мітками, після чого доставляються на ендоплазматичний ретикулум за участі АТФ-залежного переносника родини ABC-транспортерів TAP (Transporter associated with antigen processing, транспортер, пов'язаний з презентацією антигену) [8]. Ці пептиди можуть піддаватися додатковій обробці амінопептидазами ERAP1 та ERAP2 (Endoplasmic reticulum aminopeptidases 1/2) безпосередньо перед завантаженням у комплекс HLA. Процес посадки на пептид-зв'язувальну борозенку молекули I класу відбувається за участі PLC комплексу (Peptide-loading complex, пептид-завантажувального комплексу), який складається з шаперонових протеїнів – кальретикуліну, тапазину, ERp57 (Endoplasmic Reticulum protein 57) та TAP-зв'язувального протеїну (TAPBP), а також забезпечує стабільність молекул HLA до моменту зв'язування з пептидами. Після формування, утворений комплекс HLA-пептид експортується через апарат Гольджі на поверхню клітини для презентації антигену CD8⁺ Т-клітинам [9].

Молекули HLA II класу спеціалізуються на презентації антигенів екзогенного походження, яких формуються в результаті протеолітичної деградації в ендосомах. На відміну від I класу, вони не здатні приєднувати ліганди в ендоплазматичному ретикулумі, оскільки їхня борозенка додатково

стабілізується інваріантним ланцюгом (Ii), який запобігає передчасному зв'язуванню інших пептидів. Спочатку молекула HLA транспортується через апарат Гольджі до особливого компартменту МНС класу II (МІІС) [8]. Кислі протеази катепсин S та катепсин L, що там присутні, активуються та забезпечують деградацію інваріантного ланцюга, а його залишки (CLIP, class II associated invariant chain peptide, залишковий пептид Ii, пов'язаний з класом II), залишається у пептид-зв'язувальній борозенці молекули HLA і пізніше замінюється на антигенний пептид. Цей процес вимагає шаперону HLA-DM, який є гомологом HLA II класу і здатний витіснити CLIP. Після остаточного процесингу, молекули, завантажені антигенним пептидом, транспортуються до клітинної мембрани, де презентують їх CD4+ Т-клітинам [9, 10].

Окрім класичних молекул HLA, у регуляції презентації антигенів беруть участь некласичні – HLA-E, HLA-F, HLA-G та інші, які кодуються HLA I класу і характеризуються обмеженим поліморфізмом та специфічними імуномодулюючими функціями. Вони можуть зв'язувати пептиди, утворені в ході внутрішньоклітинного процесингу, та взаємодіяти з рецепторами імунних клітин, зокрема НК-клітин, впливаючи на активацію або пригнічення імунної відповіді [7, 11].

1.3. Вплив системи HLA на процеси імунного контролю та механізми розвитку онкогематологічних захворювань

Імунний контроль з боку системи лейкоцитарного антигену людини відбувається шляхом розпізнавання пептидних фрагментів Т-клітинами, що допомагає імунній системі знищувати інфіковані вірусами або злоякісно трансформовані клітини. Ключовим процесом є презентація неоантигенів – фрагментів мутованих пептидів, що є унікальними маркерами пухлин, системою HLA Т-клітинам. Специфічність імунної відповіді забезпечується високою афінністю взаємодії цих неоантигенів, експонованих у борозенці

молекул HLA з Т-клітинними рецепторами (T-cell receptor, TCR) [10]. Вони, в свою чергу, зазнають селективного відбору в тимусі, і в разі порушення реакції на антигени – елімінуються. Після взаємодії TCR з комплексом HLA-пептид, Т-клітини піддаються клональній експансії та диференціюють, що забезпечує формування специфічної імунної відповіді [12].

Ефективність такого контролю залежить від генетичного різноманіття системи лейкоцитарного антигену людини. Поліморфізм генів HLA, зосереджений переважно в ділянці пептид-зв'язувальної борозенки, надає імунній системі суттєву перевагу завдяки великій варіабельності алелів. Це зумовлює високу ймовірність формування гетерозиготного стану, за якого поєднання батьківських і материнських алелів забезпечує експресію ширшого репертуару молекул HLA, здатних презентувати максимально різноманітний спектр антигенних пептидів [13, 14].

Особливістю імунного контролю з боку Т-клітин є їхня алореактивність, яка базується на здатності Т-клітинного рецептора до перехресного розпізнавання різних алельних форм HLA. Це явище еволюційно виникло як механізм виявлення будь-яких змін у структурі пептид-зв'язувальної борозенки. Оскільки більшість алореактивних клонів реагують на комплекс HLA-пептид лише за наявності специфічного ліганду, цей механізм забезпечує надчутливий імунний нагляд за антигенним складом клітин [4, 9]. Паралельно з функціонуванням системи HLA в цьому процесі, реалізується перша лінія імунного захисту, ключову роль в якій виконують НК-клітини. Молекули HLA I класу, завдяки своїй експресії на всіх ядерних клітин, виступають лігандами для рецепторів цих клітин – KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors). Така взаємодія дозволяє НК-клітинам елімінувати злоякісні клони в разі зміни або відсутності експресії HLA, що також допомагає в імунному контролі, навіть за умови їхнього маскування для Т-клітин [15].

Як відомо, розвиток онкогематологічних захворювань є динамічним процесом імунної селекції. На ранніх стадіях злоякісні клітини зазвичай є HLA-позитивними, що дозволяє Т-клітинам ефективно їх знищувати. Проте

під постійним тиском імунної системи відбувається виживання та експансія лише тих клонів, які набули здатності до імунної втечі (immune escape) [16]. Ця еволюція пухлини призводить до появи гетерогенних популяцій з різними фенотипами експресії HLA, де імуногенні клони елімуються, а HLA-негативні клони формують резистентну пухлинну масу [17].

Певні особливості індивідуального HLA-фенотипу пацієнта можуть обмежувати здатність імунної системи ідентифікувати специфічні пухлинні антигени. Розвиток та прогресування онкогематологічних захворювань безпосередньо корелюють зі здатністю злоякісних клонів до імунного маскуванню через дефекти в системі HLA [18]. Одним із механізмів такої «втечі» є порушення функціонування антигенпрезентуючої машинерії (APM), що включає зниження експресії транспортеру TAP, субодиниць протеасоми та шаперонів PLC-комплексу. Такі порушення унеможливають завантаження пухлиноасоційованих пептидів у борозенку HLA, роблячи клітини непомітними для Т-клітин. Окрім функціональних дефектів, значну роль відіграють також структурні генетичні зміни, зокрема мутації у гені *B2M* (β 2-мікроглобулін), що призводять до повної втрати стабільності та експресії молекул HLA I класу на плазматичній мембрані злоякісних клітин [19, 20].

Особливе значення при випадках рецидиву онкогематологічного захворювання має втрата гетерозиготності за генами HLA (HLA-LOH, Loss of Heterozygosity), за якої відбувається селективне видалення алелів або цілого гаплотипу, що презентують найбільш імуногенні епітопи. Щоб обійти імунний контроль з боку НК-клітин, пухлина застосовує експресію неklasичних молекул, наприклад HLA-G, які імітують наявність HLA, але виступають інгібіторами активності лімфоцитів [21, 22]. Також епігенетична репресія генів HLA та мутації в регуляторі SP1A (для HLA II класу) додатково обмежують участь CD8⁺ та CD4⁺ Т-клітин у протипухлинній відповіді. Таким чином, комбінація генетичних та епігенетичних аномалій у системі HLA визначає здатність злоякісного клону до резистентності та подальшої експансії, що

обумовлює необхідність високоточного молекулярно-генетичного моніторингу на різних етапах терапії [23].

1.4. Алогенна трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин та її вплив на імуногенетичні механізми рецидивів

Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин (ТГСК) на сьогодні є одним з найуспішніших методів лікування широкого спектра онкогематологічних захворювань, зокрема гострого мієлоїдного лейкозу (ГМЛ) [24]. У багатьох клінічних випадках вона виступає альтернативою традиційній хіміотерапії, оскільки дозволяє досягти тривалої ремісії та знижує ризик виникнення рецидивів. Однак, попри терапевтичну ефективність, ТГСК пов'язана з ризиком розвитку низки ускладнень, серед яких – реакція «трансплантат проти хазяїна» [25].

Алогенна трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин (ало-ТГСК) – це повна заміна пулу клітин кровотворення реципієнта гемопоетичними стовбуровими клітинами донора. Сумісність за алельним складом HLA донора і реципієнта є вирішальним фактором, який визначає успішність трансплантації та ризик відторгнення і ускладнень типу «трансплантат проти хазяїна». Це є найбільш ефективний метод при лікуванні гематологічних злоякісних новоутворень, адже трансплантована імунна система націлена на знищення трансформованих клітин хазяїна завдяки реакції «трансплантат проти лейкоїї», за якої донорські Т- та NK-клітини розпізнають й знищують залишкові лейкоїчні клітини, що фактично замінює імунний контроль реципієнта більш агресивною системою донора [26, 27].

Основним імуногенетичним викликом при ало-ТГСК є двонаправлена алореактивність. Вона проявляється через атаку тканин реципієнта донорськими Т-клітинами – гостра реакція GvHD і потенційну гуморальну відповідь реципієнта, що загрожує відторгненням графта [28, 29].

Особливе місце у сучасній клінічній практиці, посідає гаплоідентична трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин (гапло-ТГСК), де сумісність за HLA реалізована лише наполовину (за одним гаплотипом) і відбувається переважно від родинних донорів. Цей тип трансплантації дозволяє знайти донора практично для кожного пацієнта, не витрачаючи час на тривалий пошук повністю сумісного неспорідненого донора в реєстрах [30]. Саме гапло-ТГСК демонструє високу ефективність проти клітин реципієнта, включаючи злоякісно-перероджені, тобто дозволяє досягти ефекту «трансплантат проти лейкемії». Однак існує високий ризик реакції «трансплантат проти хазяїна» і тому, баланс між корисною реактивністю GvL та GvHD залежить від дози введених Т-клітин, часового проміжку між трансплантацією та інфузіями лімфоцитів, а також генетичної різниці між донором і реципієнтом. Інструментом досягнення цього балансу є використання алельних невідповідностей між донором і реципієнтом за специфічними алелями HLA для індукції селективної Т-клітинної відповіді проти злоякісних клітин пацієнта. Зокрема, якщо молекули HLA II класу селективно експресуються на гемопоетичних клітинах, включаючи лейкемічні бласти за умов відсутності запалення, то вони можуть контролювати пухлину з обмеженим ризиком розвитку реакції GvHD [31, 32].

Розвиток рецидиву після трансплантації є результатом імунної втечі пухлини під дією інтенсивного селективного тиску з боку трансплантата [33]. Першочергово, повернення захворювання може бути зумовлене недостатньою протилейкемічною ефективністю режиму кондиціонування, коли залишкова пухлинна маса досягає порогу, за якого ефект «трансплантат проти лейкемії» здатний забезпечити повне знищення злоякісного клону [34].

На імуногенетичному рівні є декілька механізмів розвитку рецидиву. Ключовим з них є порушення розпізнавання лейкемічних клітин через втрату геномних ділянок або порушення експресії HLA, а також дефекти в механізмі презентації антигенів [16]. Особливо після гапло-ТГСК явище втрати неспареного HLA-гаплотипу є досить поширеним і робить пухлину

«невидимою», як для донорських лімфоцитів, так і для НК-клітин [35]. Іншим варіантом уникнення імунної відповіді з боку пухлини є підвищена регуляція імунних контрольних точок (наприклад, вісь PD-1/PD-L1) та зміна цитокінового профілю мікросередовища. Зокрема, лейкемічні клітини активно підвищують експресію інгібіторних лігандів під прямим впливом драйверних мутацій, які активують промотор PD-L1 і виснажують пул донорських Т-клітин. Було показано, що підвищення рівнів протизапальних цитокінів – IL-10 (interleukin-10, інтерлейкін-10) і TGF- β (transforming growth factor β , ростовий фактор трансформації бета) у лейкемічних клітинах та зниження стимуляторів імунної відповіді, як IL-15, пригнічує активність ефektorних клітин і також відіграє роль у розвитку рецидиву. Механізм цієї цитокінової модуляції з одного боку полягає у створенні супресивного мікросередовища, де IL-10 та TGF- β блокують дозрівання антигенпрезентуючих клітин і сприяють поширенню регуляторних Т-клітин. З іншого боку, дефіцит IL-15 порушує метаболічне перепрограмування та виживання НК-клітин і Т-клітин пам'яті [28, 36, 37, 38].

Додатково злаякісний клон може використовувати метаболічні шляхи за участі молекул ектонклеотидази (CD73), IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) і аргінази для виснаження донорського імунітету. Ензимами IDO та аргіназа ініціюють катаболізм триптофану і аргініну відповідно, спричиняючи метаболічне виснаження Т-клітин, тоді як CD73 забезпечує накопичення аденозину, який діє як потужний інгібітор цитотоксичної активності Т-клітин. Паралельно з цим відбувається генетична еволюція лейкемічної популяції, яка накопичує нові онкогенні мутації або втрачає гени-супресори, що забезпечує їй проліферативну перевагу. Таким чином, рецидив після ТГСК є результатом інтенсивної селекції найбільш адаптованих субклонів бластних клітин, а успіх цього терапевтичного підходу визначається здатністю донорської системи протидіяти адаптивній еволюції лейкемічного клону та підтримувати ефективний імунний контроль у посттрансплантаційному періоді [28, 29].

1.5. Роль втрати гетерозиготності за локусами лейкоцитарних антигенів людини у перебігу рецидивів онкогематологічних захворювань

Одним із небезпечних ускладнень для пацієнтів, що очікують або отримали трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин, є можливість бластних клітин уникати імунної відповіді. Втрата гетерозиготності за локусами HLA є одним із найбільш досконалих механізмів імунної втечі злоякісних клітин. Цей процес полягає у генетичній втраті цілого гаплотипу або його окремих сегментів, що призводить до того, що пухлинні клітини не розпізнаються імунною системою пацієнта як «чужі» [39].

Зміни в генах HLA є досить поширеним явищем у пацієнтів із пухлинами солідних органів, що опосередковане прямою дією селективного тиску з боку Т-клітин. На противагу цьому, для онкогематологічних захворювань такі зміни не є типовими на етапі діагностики, через що вони рідко досліджуються до моменту проведення аlogenної трансплантації або підготовки до неї [4].

Генетична втрата HLA-гаплотипу клітинами бластної популяції характерна як для мієлоїдних, так і для лімфоїдних неоплазій і проявляється приблизно в 30 % випадків рецидивів після ало-ТГСК, особливо від частково сумісних за HLA-генотипом донорів. У таких випадках ефективність терапії базується на реакції GvL, де донорські Т-клітини елімінують залишок злоякісних клітин реципієнта. Генетична втрата пацієнт-специфічного HLA-гаплотипу призводить до того, що бластні клітини стають імунологічно «невидимими» для імунітету донора [40, 41].

1.5.1. Молекулярно-генетичні механізми формування втрати гетерозиготності

Молекулярно-генетичні механізми формування ЛОН можуть реалізовуватись як через структурні зміни геному, так і без зміни кількості

копій ДНК. До механізмів із кількісною втратою генетичного матеріалу належать делеції ділянок хромосоми, які призводять до втрати одного алеля та переходу клітини з гетерозиготного стану в гемізиготний, тобто такий, що представлений лише одним алелем замість двох. До другої групи перебудов без зміни кількості копій ДНК відносять генетичну конверсію, соматичну рекомбінацію та втрату алеля з наступною редуплікацією залишкової мутованої копії [42]. Крім того, функціональна елімінація алеля може мати епігенетичний характер. Зокрема, це може відбуватися через метилювання промоторних ділянок гена, що призводить до пригнічення його експресії за умови наявності мутації в іншому гомологічному алелі, що фактично призводить до втрати гетерозиготності на функціональному рівні [43].

Залежно від того, чи супроводжуються ці механізми зміною кількості копій ДНК у локусі, події LOH поділяють на два основні типи: LOH із втратою копії (copy-loss LOH, CL-LOH) та копійно-нейтральну LOH (copy-neutral LOH, CN-LOH), коли кількість хромосом залишається нормальною. У випадку CL-LOH відбувається фізична делеція одного з алелів, натомість CN-LOH характеризується заміщенням втраченого варіанта дуплікацією копією іншого, внаслідок чого загальна кількість копій ДНК зберігається. Попри відсутність кількісних змін, генетична різноманітність у локусі зникає, що призводить до гомозиготності [39, 44].

Саме копійно-нейтральна LOH часто реалізується через механізм унібатьківської дисомії, при якій клітина містить дві копії певної ділянки хромосоми, успадковані від одного з батьків, і повністю втрачає генетичний внесок іншого. Унібатьківська дисомія може відбуватися на різних етапах онтогенезу: конститутивна – виникає на ранніх етапах ембріогенезу внаслідок помилок розходження хромосом під час мейозу, а набута – як вторинна соматична подія внаслідок мітотичної рекомбінації протягом поділу клітин окремого клону [45].

Набута унібатьківська дисомія (acquired uniparental disomy, aUPD) є найпоширенішим варіантом розвитку копійно-нейтральної втрати

гетерозиготності при рецидивах онкогематологічних захворювань. Ця генетична подія часто з'являється у популяції злоякісних клітин, що пройшли етап селекції крізь «імунологічне сито» і має критичне значення для локусів HLA [46]. Зокрема, формування aUPD у великих ділянках короткого плеча 6-ї хромосоми, де локалізовані гени людського лейкоцитарного антигену, призводить до часткової або повної втрати одного з батьківських HLA-гаплотипів на поверхні малігнізованих клітин пацієнта та переходу клітини у стан гомозиготності. Ці зміни унеможливають їхнє розпізнавання Т-клітинами донора, забезпечуючи злоякісному клону селективну перевагу та здатність до імунної втечі [47].

1.5.2. Клональні порушення та еволюція бластних клітин як передумова виникнення рецидиву

За даними Національного канцер-реєстру України (НКРУ), за останні декілька років спостерігається стійка тенденція до зростання захворюваності на новоутворення кровотворної та лімфоїдної тканин. У структурі гострих лейкозів провідне місце посідає гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ), який є однією з найагресивніших форм [48]. Ця патологія характеризується накопиченням незрілих лейкоемічних бластів з неконтрольованим ростом, зниженим рівнем їх апоптозу та нездатністю до нормального диференціювання [49].

Заповнення кісткового мозку бластними клітинами на 20 % свідчить про бластний криз, який пригнічує нормальне кровотворення. Незважаючи на первинну чутливість до терапії, у більшості пацієнтів протягом кількох років розвивається рецидив, що значною мірою пов'язано з високою динамікою клональної еволюції пухлинних клітин [27]. В основі цього процесу лежать два типи генетичних порушень, що накопичуються в гемопоетичних стовбурових клітинах протягом життя: точкові мутації в генах та хромосомні транслокації,

які призводять до утворення химерних генів і протеїнів [50, 51]. Ці порушення зазвичай охоплюють критичні функціональні групи генів, зокрема факторів транскрипції, супресорів пухлин, метилювання ДНК, модифікацій хроматину, когезинового комплексу, сплайсингу РНК та протеїнів сигнальної трансдукції. У процесі клональної еволюції ключову роль відіграють соматичні драйверні мутації, які надають клітинам селективну перевагу в рості та виживанні, визначаючи формування бластного клону. Натомість супутні їм мутації є нейтральними і накопичуються випадково, не впливаючи безпосередньо на життєздатність клітин. Для повної трансформації нормальної гемопоетичної стовбурової клітини у лейкемічну необхідне накопичення кількох типів драйверних мутацій. Це називається моделлю «двох ударів»: розвиток лейкемії зумовлений поєднанням принаймні двох типів мутацій – до першого належать мутації, що стимулюють проліферацію популяції і це створює великий клон, морфологічно нормальних, але змінених генетично клітин; другий тип – мутації, що блокують їхнє диференціювання, після яких клітина миттєво стає лейкемічною і потрапляє під неконтрольований поділ або бластний криз. У результаті формується змінена популяція клітин, яка з часом витісняє нормальний гемопоез [50, 52].

Процес формування домінантного лейкемічного клону реалізується через послідовні стадії клональної еволюції, кожен з яких характеризується специфічним набором генетичних подій [53]. Прелейкемічна стадія ініціюється виникненням соматичних мутацій у гемопоетичних стовбурових клітинах. Найчастіше ці зміни стосуються генів епігенетичного регулювання *DNMT3A* (ДНК-метилтрансфераза 3 α , DNA Methyltransferase 3 α) та *TET2* (Тет-метилцитозиндіоксигеназа 2, Tet Methylcytosine Dioxygenase 2), що відповідають за метилювання і деметилювання ДНК, а також групи генів модифікацій хроматину (*ASXL1* (Additional Sex Comb Like 1)) [50, 54, 55]. На цьому етапі клітини зберігають здатність до нормального диференціювання, проте набувають підвищеного потенціалу самовідновлення, що призводить до клонального гемопоезу. Важливою особливістю прелейкемічних клонів є їхня

здатність перебувати у стані спокою (G_0 -фазі), що надає їм природну хіміорезистентність [56]. Це дозволяє їм виживати в кістковому мозку навіть після досягнення повної ремісії, слугуючи генетичним резервуаром для подальшого накопичення мутацій. Лейкемічна стадія супроводжується зупинкою диференціювання клітин і початком інтенсивної проліферації бластів. Перехід до вираженого лейкозу відбувається внаслідок появи мутацій у генах транскрипційних факторів *RUNX1* (Runt Related Transcription Factor 1), *CEBPA* (CCAAT Enhancer Binding Protein α), *GATA2* (GATA Binding Protein 2) або специфічних змін, зокрема в гені *NPM1* (Nucleophosmin 1) [57, 58]. Будучи спільним маркером для всієї пухлинної популяції клітин, ці зміни призводять до формування специфічного лейкемічного фенотипу. На цьому етапі бластні клони масово заселяють кістковий мозок, витісняючи здорові гемопоетичні стовбурові клітини. Пізня стадія характеризується субклональною гетерогенністю та накопиченням додаткових мутацій у генах сигнальних шляхів *FLT3* (Fms Related Tyrosine Kinase 3), *KIT* (KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase), *KRAS/NRAS* (Proto-Oncogene, GTPase) [49]. Ці зміни часто виникають під дією селективного тиску хіміотерапії, коли чутливий домінуючий клон елімінується, а субклони з резистентністю виживають і стають причиною швидкого розвитку рецидивів [59].

Особливого значення клональна еволюція набуває в посттрансплантаційному періоді, коли зміна фізіологічного середовища та відновлення донорської імунної системи ініціюють інтенсивну селекцію бластних субклонів [60]. Під комбінованим тиском хіміотерапії та контролю з боку донорського трансплантата виникає «імунологічне сито», через яке проходять найбільш адаптовані субклони, які набули здатності до імунного маскування або додаткових мутацій, зокрема в гені-супресорі *TP53* (Tumor Protein P53). Отже, перехід від клональних порушень до активної еволюції бластних клітин визначає прогресування захворювання та його стійкість до лікування [61].

1.5.3. Втрата гетерозиготності як фактор прогнозу та терапевтичного планування при рецидивах онкогематологічних захворювань

Рецидив онкогематологічних захворювань залишається основною перешкодою на шляху до успішного лікування, що зумовлено двома основними причинами: виживанням стійких субклонів, які накопичують нові мутації, та наявністю лейкоемічних стовбурових клітин в нішах кісткового мозку у стані спокою, нечутливих до стандартної хіміотерапії [62]. Такі імуногенетичні перебудови дозволяють пухлині трансформуватися в резистентну популяцію, здатну до імунної втечі, де особливе місце посідає втрата гетерозиготності за локусами HLA.

З точки зору терапевтичного планування, виявлення втрати гетерозиготності радикально змінює підхід до лікування рецидивів після алогенної ТГСК. Наявність HLA-LOH є прямим прогностичним маркером неефективності будь-якої імунотерапії, що базується на активації існуючої донорської системи. У таких пацієнтів, традиційні методи, такі як інфузії донорських лімфоцитів (DLI) або ретрансплантація від того самого донора, демонструють вкрай низьку ефективність для досягнення ремісії захворювання, оскільки Т-клітини донора втрачають свою мішень. Замість очікуваної протипухлинної відповіді, імунна система починає атакувати здорові тканини реципієнта, що значно підвищує ризик розвитку реакції GvHD без досягнення ефекту GvL [63].

Детекція HLA-LOH на етапі рецидиву слугує прямим показанням до відмови від традиційних методів терапії на користь альтернативних стратегій. Головною метою лікування у таких випадках є, спочатку, знищення лейкоемічних клітин за допомогою протилейкемічної терапії, а потім – відновлення імунної реакції через механізми, що не залежать від втраченого HLA-гаплотипу [62].

Оскільки імунний контроль з боку донора при LOH втрачено, з одного боку, застосовується біохімічне пригнічення пухлини прямими

антилейкемічними методами, до яких належать: таргетована терапія з використанням специфічних інгібіторів ключових онкогенних шляхів (*FLT3*, *IDH1/2* та *BCL2*); використання гіпометилуючих агентів та гістон-деацетилазних інгібіторів; цитотоксична хіміотерапія з препаратами Цитарабін, Флударабін, Антрацикліни [64]. З іншого боку, для відновлення реакції GvL розглядаються підходи, що дозволяють обійти механізм імунної втечі пухлини. Вони полягають в модифікації імунного мікросередовища і найефективнішою стратегією є повторна аlogenна ТГСК від іншого донора з іншим гаплотипом, чиї HLA-антигени все ще присутні на поверхні пухлини. Також інші способи, як застосування інгібіторів контрольних точок (анти-*CTLA4*, анти-*PD1*), НК-клітинної терапії або CAR-T терапії, спрямованих проти антигенів CD33, CD123 чи CLL1, мають місце в сучасних протоколах лікування рецидивів [65, 66, 67].

Діагностика HLA-LOH у посттрансплантаційному періоді є складним завданням через низку обмежень. На ранніх етапах рецидиву кількість бластних клітин може бути недостатньою для детекції втрати гетерозиготності. Це створює «сліпу зону» для стандартних генетичних методів, де генотип пухлини може помилково імітувати донорський. Для отримання достовірних результатів важливою є попередня сепарація пухлинної популяції з подальшим молекулярно-генетичним дослідженням генів HLA [68].

Таким чином, моніторинг HLA-LOH трансформується з теоретичного дослідження у критичний інструмент прийняття клінічних рішень. Своєчасна детекція клональної еволюції дозволяє реалізувати концепцію превентивної персоналізованої медицини, надаючи можливість радикально змінити тактику лікування ще до клінічної маніфестації агресивного рецидиву.

1.6. Молекулярно-генетичні методи, які використовуються для визначення втрати гетерозиготності за антигенами лейкоцитів людини у сучасній лабораторній практиці

Визначення генетичного статусу системи людського лейкоцитарного антигену (HLA) є критично важливим для оцінки сумісності між донором і реципієнтом перед трансплантацією, а також моніторингу ускладнень після неї. Ефективність виявлення генетичних змін безпосередньо залежить від обраної технології дослідження. Сучасні молекулярно-генетичні методи еволюціонували від низькороздільного типування із застосуванням праймерів, специфічних до послідовності (sequence-specific primers, SSP) до високоточних методів прямого зчитування послідовностей, таких як секвенування за Сенгером та секвенування нового покоління (NGS).

1.6.1. HLA-типування із застосуванням праймерів, специфічних до послідовності (Sequence-specific primers, SSP) для оцінки алельного складу генів HLA

Метод SSP використовує спеціалізовані праймери для ампліфікації комплементарних цільових послідовностей, дозволяючи ідентифікувати алелі за наявністю чи відсутністю специфічних смуг. ПЛР-реакція проходить в мультилункових планшетах, де кожна лунка окрім алель-специфічних праймерів, також включає внутрішній контроль до конститутивного гена. Це переважно праймери до консервативної ділянки гена β -глобіну людини [69]. Концентрація праймерів внутрішнього контролю є набагато нижчою за цільові, щоб уникнути конкурентного інгібування алель-специфічної ампліфікації. Наявність контролю підтверджує ефективність проходження ПЛР-реакції та відсутність інгібіторів у зразку, що важливо для достовірності аналізу, особливо в лунках, де специфічний продукт HLA не був синтезований.

Інтерпретація результатів відбувається за допомогою візуалізації продуктів ампліфікації методом електрофорезу в агарозному гелі. Наявність специфічного профілю смуг на гелі поруч із контролем свідчить про позитивну реакцію, а підсумкове визначення генотипу HLA пацієнта здійснюється шляхом порівняння отриманого патерну ампліфікації з еталонними профілями відомих алелів в спеціальних таблицях інтерпретації або з використанням програмного забезпечення [70]. Типування з використанням специфічних праймерів вважається методом низької роздільної здатності. Його застосовують для швидкого визначення алелів невеликої кількості зразків, зокрема перед трансплантацією солідних органів, де достатнім є позначення групи, яка відображає серологічний еквівалент, на відміну від кісткового мозку, де необхідне максимальне співпадіння HLA-алелів. Хоча його скринінгова функція не дозволяє фіксувати невеликі зміни в алельному складі через обмеженість роздільної здатності, застосування даного методу виходить за межі ургентної діагностики чи органних трансплантацій. Завдяки високій чутливості до специфічних послідовностей ДНК, SSP може виступати ефективним інструментом для верифікації наявності або відсутності конкретного алеля. Така здатність методу є корисною для детекції втрати очікуваних антигенів, що допомагає вчасно зафіксувати зміну генетичного складу пацієнта [71].

1.6.2. Секвенування за Сенгером як золотий підхід для молекулярного визначення HLA-генів

Визначення точної нуклеотидної послідовності генів HLA для порівняння різних алелів стало можливим завдяки секвенуванню за Сенгером, яке і дотепер зберігає статус «золотого стандарту» типування високої роздільної здатності. В основі методу лежить принцип синтезу комплементарного ланцюга ДНК із використанням дидезоксинуклеотидтрифосфатів (ddNTPs),

кожен із яких (аденін, тимін, гуанін і цитозин) мічений специфічним флуорофором, що випромінює світло певної довжини хвилі. Випадкове включення ddNTP у зростаючий ланцюг призводить до зупинки синтезу, утворюючи набір фрагментів різної довжини, де кінцевий нуклеотид визначає колір флуоресценції: зелений для аденіну, червоний для тиміну, чорний для гуаніну, синій для цитозину [71]. Процес ідентифікації фрагментів ДНК реалізується шляхом капілярного електрофорезу, який замінив розділення у поліакриламідному гелі. Під час проходження ДНК через вузький капіляр, лазерний детектор реєструє інтенсивність кольорових сигналів. Отримані дані формують хроматограму, де кожен пік відповідає конкретному нуклеотиду в ланцюзі [72].

Секвенування за Сергером, як метод високої роздільної здатності, став активно застосовуватися для визначення генів HLA, витіснивши серологічні тести та класичні ПЛР-підходи. Завдяки здатності детектувати кожен окремий нуклеотид, цей метод демонструє виняткову індивідуальну точність зчитування, що є критично важливим для виявлення змін алельного складу та диференціювання гомо- та гетерозиготних станів в генах HLA [70]. Попри надійність і точність, метод має певні обмеження, зокрема: тривалість аналізу, висока вартість дослідження та складність інтерпретації результатів. Ще одним суттєвим недоліком є низька ефективність аналізу при змішаному химеризмі у посттрансплантаційному періоді, коли одночасна присутність алелів донора та реципієнта створює фоновий шум, що унеможлиблює точне генотипування [72].

1.6.3. Секвенування нового покоління (NGS) для аналізу генетичної структури HLA-генів

Секвенування нового покоління (NGS) – це технологія, яка дозволяє одночасно зчитувати мільйони ампліфікованих фрагментів ДНК. Етапи цього

методу включають ізолювання ДНК зі зразків і їхню підготовку, створення бібліотек, безпосереднє секвенування і біоінформатичний аналіз. Під час підготовки бібліотек відбувається фрагментація ДНК та лігування адаптерів, які містять унікальні штрих-коди (баркоди) для маркування кожного зразка. Це забезпечує можливість мультиплексного секвенування – паралельного зчитування великої кількості зразків в одному робочому циклі, а потім – проаналізувати кожен зразок окремо. Ключовим етапом є формування секвенувальних бібліотек – специфічно модифікованих фрагментів ДНК із приєднаними на обох кінцях молекул адаптерів, які забезпечують маркування зразків, ефективність ампліфікації і фіксацію всередині секвенатора [70].

Для реалізації методу NGS найчастіше використовують різні платформи, зокрема «Illumina» та «Ion Torrent S5». Вони відрізняються принципами детекції сигналу – від флуоресцентної реєстрації нуклеотидів до напівпровідникового зчитування іонів водню, однак їхньою спільною перевагою є масивний паралельний аналіз тисяч фрагментів ДНК, що забезпечує глибину зчитування та високу точність результатів. Попри це, впровадження технології NGS в клінічну практику супроводжується низкою обмежень, пов'язаних з високою вартістю обладнання, потребою у великій кількості зразків для одного циклу, тривалістю підготовки бібліотек і складним біоінформатичним аналізом з використанням спеціалізованого програмного забезпечення. Особливі труднощі виникають при роботі з посттрансплантаційними зразками зі змішаним генетичним профілем донора і реципієнта. Це створює ризик хибної інтерпретації результатів, оскільки програмне забезпечення може помилково сприйняти мінорні зміни алельного складу або нехарактерні сигнали на фоні змішаного химеризму як фоновий шум. Критичним у таких випадках є налаштування порогів детекції (thresholds), адже нездатність системи однозначно диференціювати зміну кількісного співвідношення алелів залишає частину структурних перебудов геному поза межами детекції [71, 73].

Таким чином, актуальність даної роботи полягає у підборі найбільш оптимального методу молекулярно-генетичного HLA-типування для своєчасної детекції явища втрати гетерозиготності, яке є одним із механізмів імунного маскування пухлини при онкогематологічних захворюваннях. Практичним застосуванням результатів дослідження є оптимізація подальших терапевтичних стратегій від корекції імунотерапії до зміни донора для пацієнтів в перед- і посттрансплантаційний періоди для запобігання прогресуванню рецидиву і розробки підходів персоналізованої медицини.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Обладнання та реагенти

Для ізолювання ДНК з периферичної крові використовували комерційний набір «NucleoSpin Dx Blood» («Macherey-Nagel», Німеччина), який містив протеїназу К (≥ 30 од/мкл), буферний розчин для промивання «BW» та «B5», буферний розчин для елюції, буферний розчин для лізису «B3», колонки NucleoSpin Dx Blood (спін-фільтри). Додатково використовували 96 % етиловий спирт та PBS (phosphate-buffered saline, фосфатний забуферений розчин).

Для молекулярно-генетичного HLA-типування з використанням праймерів, специфічних до послідовності (SSP) було використано набори Micro SSP Generic HLA Class I DNA Typing Tray, Lot 011 та Micro SSP Generic HLA Class II DNA Typing Tray DR/DQ, Lot 007 («One Lambda», США), які містили 96-лункові планшети з праймерами, захисні плівки для планшетів, «D-mix», в складі якого суміш дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTPs), Mg^{2+} , буферний розчин, гліцерин, барвник крезоловий червоний; ультрачисту агарозу «UltraPure Agarose» («Invitrogen», США), бромистий етидій («Sigma», США), буферний розчин TAE (Tris-acetate-EDTA) («Thermo Scientific», США), Taq-полімерази (5 од/мкл) («One Lambda», США).

Для проведення секвенування за Сенгером (SBT) було використано реагенти з наборів «SeCore» («One Lambda», США): «Amplification Mix», FastStart Taq-Polymerase, праймери «Primer set (Forward and Reverse)», «ExoSAP IT», буферний розчин «PPT»; формамід «Hi-Di Formamide» («Applied Biosystems», США). Додатково використовували 96 % етиловий спирт.

Для секвенування нового покоління (NGS) було використано набір «AllType FASTplex 11 Loci Kit», Lot 004 («Thermo Fisher Scientific», США), який містить: «Exon 1 Primer Mix», «Primer Mix», «dNTP», буферний розчин «DNA Suspension», буферний розчин «AllType», буферний розчин для баркодування, «Stop Solution», парамагнітні кульки, «Univ Barcode P1», «Library Primer Mix», «Library Amp Mix». Для системи «Ion Chef» використовували набір «Ion 530 ExT Kit-Chef», до якого входили: «Ion S5 Chef Supplies», «Ion S5 Chef Solutions», «Ion S5 Ext Chef Reagents». Для платформи «Ion S5» використовували: «Ion S5 [ExT] Sequencing Reagents cartridge», «Ion S5 [ExT] Wash Solution», «Ion S5 [ExT] Sequencing Solutions», «Ion S5 [ExT] Cleaning Solution», набір чипів «Ion 530». Додатково було використано «Qubit 1x dsDNA HS Working Solution».

Обладнання: міні-центрифуга «Microspin 12» («Biosan», Латвія), термостат типу «Драй-блок TDB-120» («Biosan», Латвія), міні-центрифуга «Microspin FV-2400» («Biosan», Латвія), спектрофотометр «NanoDrop One C» («Thermo Fisher Scientific», США), флуорометр «Qubit 4 Fluorometer» («Invitrogen», США), ваги електронні лабораторні РСВ 1000-1 («Kern» Німеччина), мікрохвильова піч M1712NR («Samsung» Південна Корея), блок живлення powerPRO300 («Clever Scientific», Велика Британія), гелевий резервуар multiSUB MIDI96 («Clever Scientific», Велика Британія), система гельвізуалізації iBright 1500FL («Thermo Fisher Scientific», США), термошейкер «PST-60HL» («Biosan», Латвія), генетичний секвенатор 24 капілярів «3500 XL» («Applied Biosystems», США), центрифуга «Eppendorf AG 5804 R» («Eppendorf AG», Німеччина), ампліфікатор «AC1» («Cole-Parmer», Велика Британія), ампліфікатор «Veriti Dx» («Applied Biosystems», США), шейкер «MPS-1» («Biosan», Латвія), генетичний секвенатор «Ion GeneStudio S5 System» («Thermo Fisher Scientific», США), система «Ion Chef» («Thermo Fisher Scientific», США), магнітний штатив з 96-лунками «Magnetic-Ring Stand» («Thermo Fisher Scientific», США), магнітний штатив для мікропробірок «DynaMag-2 Magnet» («Thermo Fisher Scientific», США).

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Екстракція ДНК з периферичної крові

Суть методу полягає у твердофазному ізолюванні ДНК, де після лізису клітин, вилучена ДНК адсорбується на силікатній колонці, проходить етапи очищення з подальшим елююванням:

1. Лізис зразка: у мікропробірку типу «Eppendorf» об'ємом 2 мл вносили 500 мкл цільної крові з K_2EDTA (дикалієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти) та 1000 мкл води III класу, попередньо розмороженої. Центрифугували протягом 5 хв на швидкості 8000 g за кімнатної температури. Зливали надосадову рідину. Додавали 200 мкл PBS і ретельно вортексували. Аліквоту протеїнази К об'ємом 25 мкл змішували з 200 мкл суспензії клітин у PBS, після чого вортексували та осаджували на центрифuzі. Додавали 200 мкл буферного розчину B3, зразок повторно вортексували та осаджували. Інкубували 15 хв за температури 70°C на термошейкері;

2. Адсорбція ДНК на колонках: до кожної проби додавали 210 мкл 96 % етанолу. Суміш вортексували та осаджували. Інкубували зразки за кімнатної температури протягом 5 хв. Для кожної проби використовували окрему відповідно промарковану колонку «NucleoSpin Blood», у яку переносили суміш. Центрифугували протягом 1 хв на швидкості 11000 g. Центрифугат з нижньої пробірки утилізували;

3. Відмивання силікатної мембрани колонки: колонку поміщали в нову пробірку для відходів. Додавали 500 мкл буферного розчину для промивання BW. Після центрифугування протягом 1 хв на швидкості 11000 g, зливали центрифугат з нижньої пробірки. Колонку переносили в нову пробірку для осадження. Вносили 600 мкл буферного розчину B5 та центрифугували протягом 1 хв на швидкості 11000 g. Отриманий осад зливали в контейнер для біологічних відходів, а колонку знову поміщали в пробірку для відходів. Центрифугували 1-2 хв за 11000 g (суха відкритка);

4. Елюція ДНК: колонку переносили в нову центрифужну мікропробірку типу «Eppendorf» об'ємом 1,5 мл. На мембрану наносили 100 мкл розігрітого до 70°C буферного розчину для елюції. Інкубували 2 хв за кімнатної температури. Центрифугували 1 хв за 11000 g. Елюат повторно переносили на колонку. Інкубували 5-7 хв за кімнатної температури. Потім інкубували 2 хв за кімнатної температури та центрифугували 1 хв за 11000 g. Колонку утилізували;

5. Оцінка якості та концентрації ДНК: для метода SSP проводили оцінку якості та концентрації ДНК за допомогою спектрофотометру «NanoDrop», де виділена ДНК повинна мати концентрацію 25-200 нг/мкл та співвідношення $A_{260}/A_{280} = 1,65-1,80$. Перед постановкою ПЛР-SSP праймери і реагенти для реактивної суміші розморожували за кімнатної температури (20-25°C) та ретельно вортексували перед використанням. Внутрішній контроль у вигляді праймерів константного гена був заздалегідь внесений у кожну робочу лунку планшета виробником. Для дослідження секвенування за Сенгером проводили оцінку якості та концентрації ДНК як описано вище. Виділені зразки ДНК мали бути в концентрації 15-30 нг/мкл та показником оптичної густини A_{260}/A_{280} в межах 1,70-1,90. Для методу NGS проводили оцінку якості та концентрації ДНК за допомогою флуорометра Qubit, де оптимальна робоча концентрація ДНК становила 25 нг/мкл, а якість за співвідношенням оптичної густини $A_{260}/A_{280} \approx 1,80$.

2.2.2. Визначення послідовності генів людського лейкоцитарного антигену з використанням специфічних праймерів (SSP)

Метод SSP базується на селективній ампліфікації ДНК із використанням олігонуклеотидних праймерів, специфічних до окремих алелів або їх груп, які відповідають унікальним послідовностям певних локусів HLA. Полімеразно-ланцюгова реакція може проходити лише за умови повної

комплементарності 3'-кінця праймера з цільовою послідовністю ДНК-матриці, що інтерпретується як позитивний результат, тоді як наявність хоча б однієї невідповідності призводить до того, що ампліфікація не відбувається, і це свідчить про негативний результат. Контроль якості та виключення хибнонегативних результатів, спричинених інгібіторами або низькою якістю ДНК, забезпечують праймери консервативної ділянки гена β -глобіну людини, які виступають внутрішнім контролем. Візуалізація результатів здійснюється шляхом електрофорезу в агарозному гелі з використанням інтеркалюючого барвника під дією ультрафіолетового світла: наявність специфічної смуги між внутрішнім контролем та зоною неінкорпорованих праймерів свідчить про присутність досліджуваного HLA-антигену:

1. Підготовка реакційних сумішей і ампліфікація: реакцію проводили у 96-лункових планшетах із попередньо нанесеними специфічними праймерами. Спочатку готували майстер-мікс окремо для локусів I та II класів HLA: змішували 1000 мкл «D-mix», 111 мкл досліджуваної ДНК та 5,6 мкл рекомбінантної Taq-полімерази (5 Од/мкл) для I класу, та 360 мкл «D-mix», 39 мкл досліджуваної ДНК та 2 мкл рекомбінантної Taq-полімерази (5 Од/мкл) для II класу (загальний об'єм суміші – 1116,6 мкл та 401 мкл відповідно). Після інтенсивного вортексування та осадження на мікроцентрифузі, по 10 мкл отриманої робочої суміші піпетували у кожну лунку відповідного планшета, крім лунки негативного контролю. Планшет герметизували спеціальною підкладкою та поміщали у термоциклер. Ампліфікацію проводили за протоколом «One Lambda» (табл. 2.1);

Таблиця 2.1

Програма ампліфікації для проведення ПЛР-SSP

Температура	Час	Кількість циклів
96°C	130 с	1
63°C	60 с	
96°C	10 с	9
63°C	60 с	
96°C	10 с	20
59°C	50 с	
72°C	30 с	
4°C	∞	-

2. Приготування гелю: 2 % агарозний гель готували, змішуючи 2 г полімерного матеріалу агарози зі 100 мкл 1х буферного розчину ТАЕ. Суміш нагрівали в мікрохвильовій печі протягом 3 хв за потужності 700 Вт до утворення гомогенного розчину. Після охолодження до нього додавали 50 мкл етидію броміду (0,5 мкг/мл) і заливали у форму з 14-ма гребінками. Час застигання становив 15 хв, а розмір гелю – 12 на 10 см;

3. Гель-електрофорез: після завершення ПЛР, продукти ампліфікації (по 5 мкл) переносили у лунки 2 % агарозного гелю у послідовності зліва направо і зверху вниз. Негативний контроль у тому самому об'ємі вносили у першу лунку гелю. Додавання барвника не було потрібним, оскільки він входить до складу «D-mix». Електрофорез проводили протягом 8 хв за напруги 150 В та силою струму 65 мА до моменту міграції барвника на 0,5 см у гель;

4. Зчитування та інтерпретація даних: гель-візуалізацію проводили на системі «iBright» з подальшою фотофіксацією. У кожній лунці, крім негативного контролю, мала бути присутня смуга внутрішнього контролю, що мігрувала повільніше. Про позитивний контроль свідчила наявність смуги ампліфікату, яка мігрувала швидше за внутрішній контроль. Інтерпретацію результатів проводили за допомогою програмного забезпечення «HLA Fusion 4.6.1» та лот-специфічних робочих таблиць, наданих виробником наборів [74].

2.2.3. Секвенування генів людського лейкоцитарного антигену за Сенгером

В основі принципу методу секвенування за Сенгером у системі «SeCore» лежить пряме визначення алельного складу генів HLA шляхом точкового зчитування нуклеотидної послідовності екзонів з використанням флуоресцентно мічених дидезоксинуклеотидів, які спричиняють термінацію синтезу ланцюга ДНК. Фрагменти, що утворилися, розділяються за розміром за допомогою капілярного електрофорезу, а отримані дані про послідовності інтерпретуються шляхом порівняння з референсними базами алелів у спеціалізованому програмному забезпеченні «HLA Fusion 6.0»:

1. Ампліфікація ДНК: майстер-мікс для ПЛР-реакції готували шляхом додавання 19,8 мкл «Amp Mix» та 0,2 мкл Таq-полімерази, вортексували і осаджували. Додавали по 5 мкл ДНК у відповідні пробірки (загальний об'єм суміші – 25 мкл). Заклеювали плівкою та осаджували. Використовували завчасно створену ПЛР-програму «SeCore», описану в табл. 2.2. Після досягнення блоку термоциклера позначки $> 80^{\circ}\text{C}$, поміщали в нього планшет, закривали кришку. Запускали ампліфікацію зразків ДНК;

Таблиця 2.2

Програма І ампліфікації для проведення секвенування за Сенгером

Температура	Час	Кількість циклів
95°C	4 хв	1
95°C	20 с	35
63°C	20 с	
72°C	40 с	
72°C	5 хв	1
4°C	∞	-

2. Ензиматичне очищення ампліконів: перед використанням всі реагенти вортексували та центрифугували. Плашку з ампліконами осаджували центрифугуванням. До кожної лунки, що містила ПЛР-продукти додавали по 4 мкл «ЕхоSAP IT». Лунки планшету закривали кришками і вортексували інтенсивно 1 хв, центрифугували протягом 1 хв при 700 g. Кінцеву інкубацію проводили в ампліфікаторі за програмою «ЕхоSap», як описано в табл 2.3;

Таблиця 2.3

Програма очищення ампліконів за допомогою ЕхоSap

Температура	Час	Кількість циклів
37°C	20 хв	1
80°C	20 хв	1
4°C	∞	-

3. Реакція секвенування: у кожен лунку 96-лункового оптичного планшета з V-подібними лунками додавали по 2 мкл ампліконів, щоб кількість зайнятих стовпців у плашці була кратна трьом. Потім у кожен лунку додавали по 8 мкл праймерів відповідного типу – Forward або Reverse. Інтенсивно вортексували 1 хв і центрифугували протягом 1 хв при 700 g. Поміщали плашку в термоциклер і запускали відповідну програму «SeCore», описану в табл. 2.4. Коли блок ампліфікатора нагрівся понад 80°C, поміщали в нього планшет і закривали кришку;

Таблиця 2.4

Програма II ампліфікації для проведення секвенування за Сенгером

Температура	Час	Кількість циклів
95°C	20 с	25
50°C	15 с	25
60°C	60 с	25
4°C	∞	-

4. Преципітація етанолом: до кожної лунки 96-лункового планшета з ампліконами додавали по 2 мкл буферного розчину «PPT», попередньо вортексувавши. Перемішували піпетуванням. Закривали планшет гумовою заглушкою та сильно струшували. Додавали 40 мкл 96 % етанолу в кожен лунку, інтенсивно вортексували протягом 1 хв і центрифугували 30 хв при 3500 g. Одним різким рухом спорожняли лунки планшета. Не перевертаючи планшет, поміщали його на суху серветку і центрифугували ще 1 хв при 550 g. Додавали по 100 мкл 80 % етанолу до кожної лунки і центрифугували 5 хв при 2000 g. Повторювали видалення залишків реагентів із лунок планшета шляхом струшування. Не перевертаючи планшет, поміщали його на суху серветку і

центрифугували 1 хв при 550 g. Додавали до кожної лунки по 15 мкл «Hi-Di» формаміду. Щільно закривали лунки гумовою септою і центрифугували 1 хв при 700 g. Поміщали в ампліфікатор, де відбувалася денатурація зразків при 95°C протягом 2 хв (табл. 2.5);

Таблиця 2.5

Програма денатурації зразків

Температура	Час	Кількість циклів
95°C	2 хв	1
4°C	∞	-

5. Капілярний електрофорез і детекція: після видалення бульбашок повітря шляхом центрифугування на високій швидкості, 96-лунковий планшет зі зразками герметизували гумовою септою і поміщали у секвенатор. Секвенування проводили на генетичному секвенаторі 24 капілярів «3500 XL» за попередньо створеним протоколом згідно інструкції виробника до реагентів.

2.2.4. Визначення генетичної послідовності лейкоцитарного антигену людини за допомогою секвенування нового покоління (NGS)

Принцип методу NGS із застосуванням набору «AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit» базується на мультиплексній ампліфікації цільових генів HLA з подальшим створенням бібліотеки фрагментів для секвенування на напівпровідниковій платформі «Ion Torrent S5». Даний підхід забезпечує рівномірне покриття потрібних ділянок геному і гарантує отримати

високоточні результати HLA-типування за допомогою програмного забезпечення «TypeStream™ Visual 3.1»:

1. Ампліфікація: в 96-лункову пляшку вносили по 4 мкл досліджуваної ДНК. Готували мастер-мікс, до складу якого входило 9,3 мкл буферного розчину «AllType», 0,8 мкл «dNTP», 4 мкл «Primer Mix» та 1,5 мкл «Exon 1 Primer Mix», в розрахунку на один зразок. здійснювали у мікроцентрифужній пробірці, Після цього перемішували і центрифугували суміш. Додавали 0,4 мкл полімерази («AllType LR Polymerase») і піпетували. Робочу суміш розподіляли по 16 мкл в кожен лунку стріпа, після чого вносили по 4 мкл досліджуваної ДНК. Стріпи герметично закривали кришками, центрифугували і поміщали у попередньо підігрітий ампліфікатор, запускали програму (табл. 2.6);

Таблиця 2.6

Програма ампліфікації «HLA 11-Loci Amplification Illumina»

Температура	Час	Кількість циклів
94°C	2 хв	1
98°C	10 с	30
69°C	3 хв	
4°C	∞	-

2. Очищення ампліконів: спочатку підготували парамагнітні кульки, які витримували за кімнатної кімнатній температури 30 хв і вортексували протягом, поки розчин не став гомогенним. Одночасно з цим приготували свіжий робочий розчин 80 % етанолу. До кожної лунки стріпу з ампліконами вносили по 12 мкл суспензії парамагнітних кульок. Суміш ретельно перемішували 10 разів шляхом піпетування, уникаючи формування

бульбашок, і інкубували за кімнатної температури протягом 5 хв. Розміщували стріпи на магнітному штативі після інкубації і тримали 3 хв до тих пір, поки розчин не став прозорим. Після цього відбирали 30 мкл надосаду, не зачепивши кульки. Не знімаючи стріпи з магніту, проводили промивання по 100 мкл 80 % етиловим спиртом два рази, кожного разу інкубуючи протягом 30 с і відбираючи 110 мкл рідини з кожної лунки. Після фінального промивання залишки етанолу видаляли автоматичним дозатором, зразок підсушували (~ 2 хв). Стріпи знімали з магніту і додавали по 27 мкл буферного розчину «DNA Suspension» в кожну лунку. Перемішували шляхом піпетування 10 разів і інкубували протягом 3 хв за кімнатної температури. Повертали плашку на магніт і після осаджування, відбирали 25 мкл ампліконів у нові стріпи;

3. Визначення концентрації ампліконів і їхнє розведення: перед початком роботи витримували «Qubit 1x dsDNA HS Working Solution», Standard #1, Standard #2 та буферний розчин «DNA Suspension» за кімнатної температури 30 хв. Кількісну оцінку ДНК проводили на флуориметрі Qubit за протоколом «1x dsDNA High Sensitivity». Для підготовки робочих сумішей до пробірок додавали по 190 мкл «Qubit 1x dsDNA HS Working Solution» та по 10 мкл відповідного стандарту. До пробірок зі зразками додавали 198 мкл «Qubit 1x dsDNA HS Working Solution» та 2 мкл ампліконів. Вортексували та осаджували. Інкубували у темряві 2 хв. Підготували нові стріпи, позначивши кожну лунку номером амплікону. Розводили амплікони у новій плашці з буферним розчином «DNA Suspension» до концентрації 25 нг/мкл. Піпетували і вортексували, потім осаджували;

4. Пришивання індивідуальних баркодів, зупинка реакції, створення пулу бібліотеки та очищення: осаджували вміст лунок центрифугуванням на швидких обертах. Поміщали «FASTplex Sample Plate 48» на лід та знімали захисну плівку. Переносили 16 мкл попередньо розморожених індивідуальних баркодів у відповідні лунки стріпів. Додавали 8 мкл розведених ампліконів, піпетували 10 разів, уникаючи утворення бульбашок. Додавали 12 мкл

буферного розчину для баркодування до кожної лунки і перемішували легким піпетуванням. Осаджували вміст стріпів на швидких обертах. Поміщали в попередньо прогрітий термоциклер. Запускали програму «TAG FASTPLEX» (табл. 2.7);

Таблиця 2.7

Програма ампліфікації для відпалу індивідуальних баркодів

Температура	Час	Кількість циклів
55°C	15 хв	1
25°C	∞	-

Після ампліфікації, осаджували вміст лунок стріпів. Додавали 18 мкл «Stop Solution» до кожної лунки, перемішуючи 5 разів піпетуванням. Осаджували на швидких обертах. Поміщали в термоциклер. Запускали програму «STOP FASTPLEX» (табл. 2.8);

Таблиця 2.8

Програма ампліфікації для зупинки реакції

Температура	Час	Кількість циклів
68°C	10 хв	1
25°C	∞	-

Вортексували парамагнітні кульки не менше ніж 30 с. Осаджували амплікони. У пробірку типу «Eppendorf» об'ємом 2 мл переносили 25 мкл кожного зразка, перемішували вміст піпетуванням. Переносили 864 мкл пулу

бібліотек у другу аналогічну пробірку. Додавали парамагнітні кульки до другої пробірки у співвідношенні 1:1, піпетували 10 разів, інкубували 5 хв за кімнатної температури. Поміщали пробірку на магнітний штатив, інкубували 5 хв, поки розчин не став прозорим. Відбирали надосадову рідину автоматичною піпеткою, не торкаючись кульок. Додавали 2 мл свіжого 80 % етанолу, інкубували 30 с. Відбирали надосад. Повторювали промивання етанолом. Відбирали залишки спирту і висушували вміст пробірки, поки кульки не набули матового кольору. Знімали пробірку з магніту і додавали 50 мкл буферного розчину «DNA Suspension». Піпетували та інкубували 5 хв за кімнатної температури. Інкубували пробірку на магнітному штативі 2 хв, поки розчин не став прозорим. Переносили вміст у нову пробірку типу «Eppendorf» об'ємом 2 мл;

5. Пришивання універсального баркоду і зупинка реакції: переносили очищений пул бібліотеки, буферний розчин для баркодування та «Univ Barcode P1» у нову пробірку для реакції ПЛР об'ємом 0,2 мкл, осадили. Поміщали пробірку в попередньо прогрітий ампліфікатор. Запускали програму «TAG FASTPLEX», як описано вище в табл. 2.7. Після ампліфікації, додавали мкл «Stop Solution» у пробірку з реакційною сумішшю, піпетуючи 10 разів та уникаючи формування бульбашок, осаджували. Поміщали в ампліфікатор, обирали програму «STOP FASTPLEX», як описано вище в табл. 2.8 (об'єм реакційної суміші = 100 мкл). Перед використанням парамагнітні кульки вортексували не менше 30 с. У пробірку типу «Eppendorf» об'ємом 2 мл переносили ампліфікаційну суміш з універсальним баркодом та суміш парамагнітних кульок у співвідношенні 1:1, перемішували вміст піпетуванням. Інкубували 5 хв. Поміщали пробірку на магнітний штатив, інкубували 5 хв, поки розчин не став прозорим. Відбирали надосад автоматичною піпеткою, не торкаючись кульок. Додавали 500 мкл свіжого 80 % етанолу, інкубували 30 с. Відбирали надосад. Повторювали промивання спиртом. Не знімаючи пробірку з магніту, висушували 2 хв, поки кульки не набули матового кольору. Знімали пробірку з магніту, додавали 13 мкл

буферного розчину «DNA Suspension», піпетували, інкубували 5 хв за кімнатної температури. Повторювали інкубацію на магніті ~ 2 хв або до того моменту, поки розчин не став прозорим. Переносили 10 мкл надосадової рідини у нову пробірку об'ємом 200 мкл;

6. Ампліфікація і очищення фінальної бібліотеки: у пробірку об'ємом 200 мкл вносили 75 мкл «Library Amp Mix», 15 мкл «Library Primer Mix» та 10 мкл бібліотеки з універсальним баркодом, суміш піпетували. Поміщали в попередньо прогрітий термоциклер, встановивши програму «9600-Mode-FASTPLEX ION LIBRARY» як описано в табл. 2.9 (об'єм реакційної суміші = 100 мкл).

Таблиця 2.9

Програма ампліфікації фінальної бібліотеки

Температура	Час	Кількість циклів
72°C	10 хв	1
98°C	3 хв	1
98°C	15 с	12
64°C	30 с	
72°C	1 хв	
72°C	5 хв	1
4°C	∞	-

Після ампліфікації осаджували. Переносили 95 мкл пулу фінальної бібліотеки у нову пробірку типу «Eppendorf» об'ємом 2 мл, додавали 305 мкл буферного розчину «DNA Suspension» (загальний об'єм = 400 мкл).

Вортексували парамагнітні кульки не менше ніж 30 с. До розведеної фінальної бібліотеки додавали 240 мл парамагнітних кульок, піпетували. Інкубували за кімнатної температури протягом 5 хв. Повторювали інкубацію на магнітному штативі, поки розчин не став прозорим. Відбирали 580 мкл надосадової рідини та переносили в нову пробірку типу «Eppendorf» об'ємом 2 мл. Додавали до надосаду 65,5 мл парамагнітних кульок, піпетували. Інкубували без магніту протягом 5 хв. Знову інкубували на магніті, поки розчин не став прозорим. Відбирали 650 мкл надосадової рідини. Повторювали промивання спиртом. Висушували 2 хв, поки кульки не набули матового кольору. Знімали пробірку з магніту, додавали 35 мкл буферного розчину «DNA Suspension», піпетували, інкубували 5 хв за кімнатної температури. Повторювали інкубацію на магніті, поки розчин не став прозорим. Переносили 33 мкл надосадової рідини у нову пробірку об'ємом 200 мкл;

7. Оцінка концентрації фінальної бібліотеки: для точного кількісного аналізу використовували флуорометричну систему «Qubit» як описано вище. Згідно розрахунків «NGS Calculator» у нову пробірку об'ємом 200 мкл вносили буферний розчин «DNA Suspension» і фінальний пул бібліотеки, також вортексували і осаджували. У спеціальні пробірки для «Qubit» додавали по 195 мкл «Qubit 1x dsDNA HS Working Solution» та 5 мкл ампліконів, розведених раніше. Безпосередньо перед постановкою в прилад «Ion Chef» вимірювали концентрацію розведеної бібліотеки у двох паралельних повторях (цільова концентрація розведеної фінальної бібліотеки складала 0,045 нг/мкл);

8. Запуск системи «Ion Chef»: до завантаження в систему «Ion Chef», бібліотеку зберігали на льоду. Спочатку завантажували шаблон «FASTplex» і створювали перелік зразків із зазначенням точних назв і об'ємів бібліотек, після чого цей список завантажували у систему через інтерфейс приладу. Після фінальної перевірки даних та підготовки витратних матеріалів було ініційовано систему «Ion Chef»;

9. Ініціалізація та запуск секвенування на системі «Ion S5»: після завершення запуску «Ion Chef» чіп було завантажено в секвенатор «Ion S5».

Ініціалізацію та секвенування виконували згідно з протоколом виробника. Біоінформатичний аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення «TypeStream Visual NGS Analysis Software 3.1». Для вирівнювання отриманих рідів програма використовує дані з IMGT library, що містять референсні послідовності МНС, при цьому база даних IPD-IMGT/HLA посилається на використання збірки GRCh38, як стандартного референсного геному людини. Аналіз базується на розширеній базі даних «IMGT/HLA», яка містить понад 40 000 алельних варіантів, що забезпечує високу точність ідентифікації нових та рідкісних алелів [74].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Ефективність алогенної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин при лікуванні онкогематологічних захворювань безпосередньо залежить від точності HLA-типування та ступеня сумісності донора і реципієнта. Проте, як свідчить клінічна практика, розвиток рецидиву часто супроводжується генетичними змінами в злоякісних клітинах, які здатні впливати на точність і достовірність повторних молекулярно-генетичних тестів. Одним із найбільш складних для діагностики явищ є втрата гетерозиготності в локусах HLA [75]. На перший погляд, методи високої роздільної здатності – секвенування за Сенгером та секвенування нового покоління – мали б забезпечувати найвищу точність ідентифікації алельного складу. Це зумовлено їхньою здатністю до прямого зчитування нуклеотидної послідовності, що теоретично дозволяє виявити будь-які відхилення від вихідного генотипу реципієнта, як описано вище [76, 77].

Однак, як демонструють результати дослідження, у випадках змішаного химеризму та втрати гетерозиготності, ці два методи високої роздільної здатності мають певні обмеження [78, 79]. Натомість, в арсеналі генетичних лабораторій, які проводять HLA-типування, є методи з нижчою роздільною здатністю, які потенційно можуть вирішити це питання. Одним із таких є полімеразно-ланцюгова реакція із застосуванням праймерів, специфічних до послідовності (SSP). Цей метод є більш чутливим інструментом для детекції специфічних змін в генотипі людського лейкоцитарного антигену. Тому метою дослідження була порівняльна оцінка аналітичної чутливості підходів молекулярно-генетичного HLA-типування з різною роздільною здатністю для детекції втрати гетерозиготності у пацієнтів із рецидивом основного онкогематологічного захворювання.

Досліджувану вибірку становили пацієнти відділення трансплантації кісткового мозку, інтенсивної мегадозової хіміотерапії та імунотерапії ДНП

«НДСЛ «Охматдит» МОЗ України» з підтвердженим рецидивом основного гематологічного захворювання, як у посттрансплантаційному періоді після алогенної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин (ТГСК), так і на дотрансплантаційному етапі. Аналіз генетичних змін у динаміці рецидиву здійснювали шляхом паралельного дослідження зразків ДНК, виділених із периферичної крові, із застосуванням методів молекулярно-генетичного HLA-типування з різною роздільною здатністю. Досліджувані спостереження охоплюють клінічні сценарії різного ступеня складності, зокрема посттрансплантаційні зміни HLA-генотипу у пацієнтів із гострою мієлоїдною лейкемією, а також часткову втрату одного з батьківських гаплотипів генів головного комплексу гістосумісності людини на етапі первинної діагностики до проведення трансплантації.

3.1. Втрата гетерозиготності в генах людського лейкоцитарного антигену у пацієнта з рецидивом гострого мієлоїдного лейкозу після алогенної ТГСК

Жінка, 40 років. У 2022 році встановлено діагноз – гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ). У червні 2023 року було проведено алогенну гаплоідентичну трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин від родинного донора – доньки. Під час проведення посттрансплантаційного моніторингу у пацієнтки було зафіксовано прогресуюче зростання популяції бластних клітин. Після досягнення рівня понад 20 %, що є критерієм встановлення рецидиву [80], спостерігалось подальше зростання частки злякисного клону до показника понад 80 %. Таким чином, пацієнтці було встановлено рецидив основного онкогематологічного захворювання.

Вихідний генотип реципієнта та донора характеризувався частковою сумісністю, а саме 50 % ідентичності за ключовими локусами I та II класів (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR та HLA-DQ), які виконують домінуючу

роль у презентації Т-клітинам донора та ініціації ефекту «трансплантат проти лейкемії». Спільний гаплотип включав наступні варіанти: А*03:01, В*07:02, С*07:02, DRB1*15:01, DQB1*06:02, тоді як альтернативні алелі реципієнтки (виділені червоним, див. табл. 3.1) мали б виступати основними мішенями для алореактивної відповіді донорської імунної системи. У період рецидиву саме унікальний гаплотип пацієнтки було втрачено внаслідок механізму імунного маскування з боку злоякісних пухлин, що дозволило їм уникнути розпізнавання Т-клітинами трансплантата.

Таблиця 3.1

Узагальнені результати HLA-типування реципієнта і донора за досліджуваними локусами

Локус	HLA-типування донора	HLA-типування реципієнта перед ало-ТГСК	HLA-типування реципієнта після ало-ТГСК
HLA-A*	02:01 ; 03:01	03:01 ; 24:02	02:01 ; 03:01
HLA-B*	07:02 ; 44:02	07:02 ; 35:03	07:02 ; 44:02
HLA-C*	07:02 ; 07:04	04:01 ; 07:02	07:02 ; 07:04
HLA-DRB1*	15:01 ; 16:01	12:01 ; 15:01	15:01 ; 16:01
HLA-DQB1*	05:01 ; 06:02	03:01 ; 06:02	05:01 ; 06:02

Примітка: червоним кольором виділено втрачені внаслідок рецидиву HLA-алелі реципієнта

Спочатку було проведено HLA-типування методом секвенування за Сенгером. На рис. 3.1 представлено вирівнювання послідовностей алелів локусу А, серед яких А*02:01 та А*03:01 (донорська частина) та референсного

алеля реципієнта A*24:02. Вирівнювання охоплює ділянку другого та третього екзонів локусу A, де зосереджена найбільша кількість поліморфних сайтів. Серед таких – позиція 282, яка представлена на збільшеному фрагменті рис. 3.1. Дана ділянка дозволяє диференціювати алелі за точковими нуклеотидними замінами, зокрема варіант гуаніну (G) є характерним для алелів A*03:01 (спільного з донором) та A*24:02 (унікального для реципієнтки), тоді як цитозин (C) у цій же позиції вказує на донорський алель A*02:01.

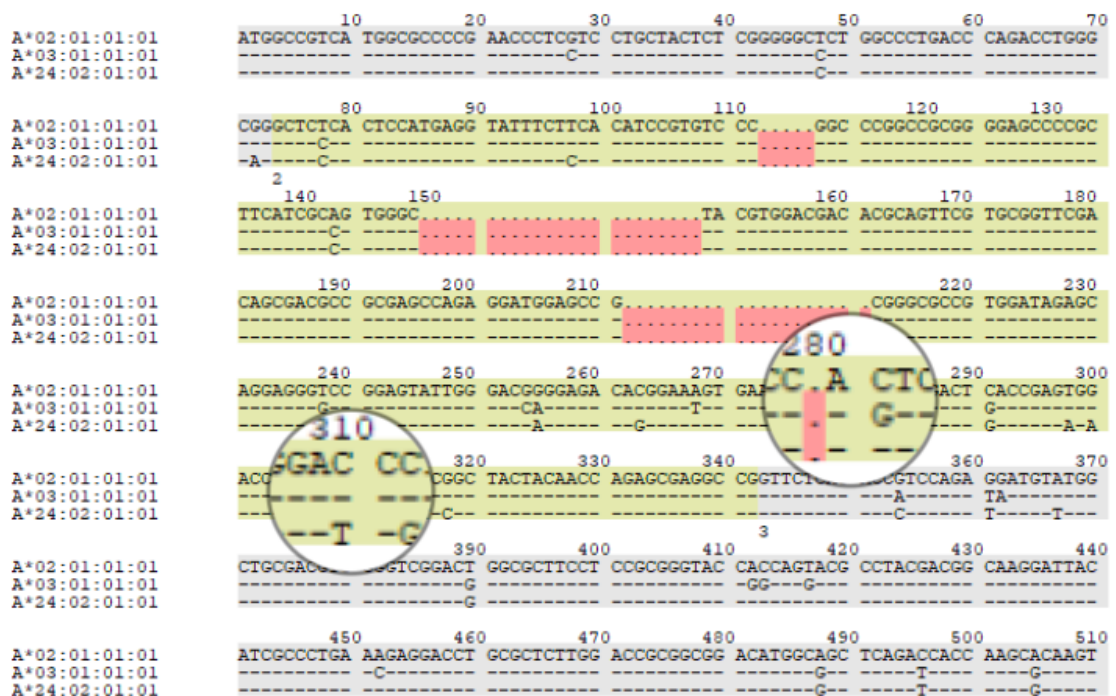


Рис. 3.1. Вирівнювання послідовностей алелів результатів секвенування за Сенгером в інтерфейсі програми «HLA Fusion 6.0»

На хроматограмі (рис. 3.2) представлено фрагмент другого екзону локусу HLA-A, зокрема вище згадану позицію 282, яка є однією з таких, що важливі для розрізнення алелів змішаного химеризму в даному локусі. У нормі для гетерозиготного стану характерна присутність подвійних піків у позиціях з поліморфізмом. Натомість, у даному випадку, результати секвенування демонструють повне домінування сигналу нуклеотиду гуаніну (G). Хоча на

хроматограмі візуально простежується мінорний пік цитозину (C), характерний для алеля A*02:01, він не був ідентифікований системою як валідний сигнал. Це зумовлено роботою біоінформатичного алгоритму інтерпретації, який не розпізнає флуоресцентні сигнали, інтенсивність яких знаходиться нижче порогу детекції.

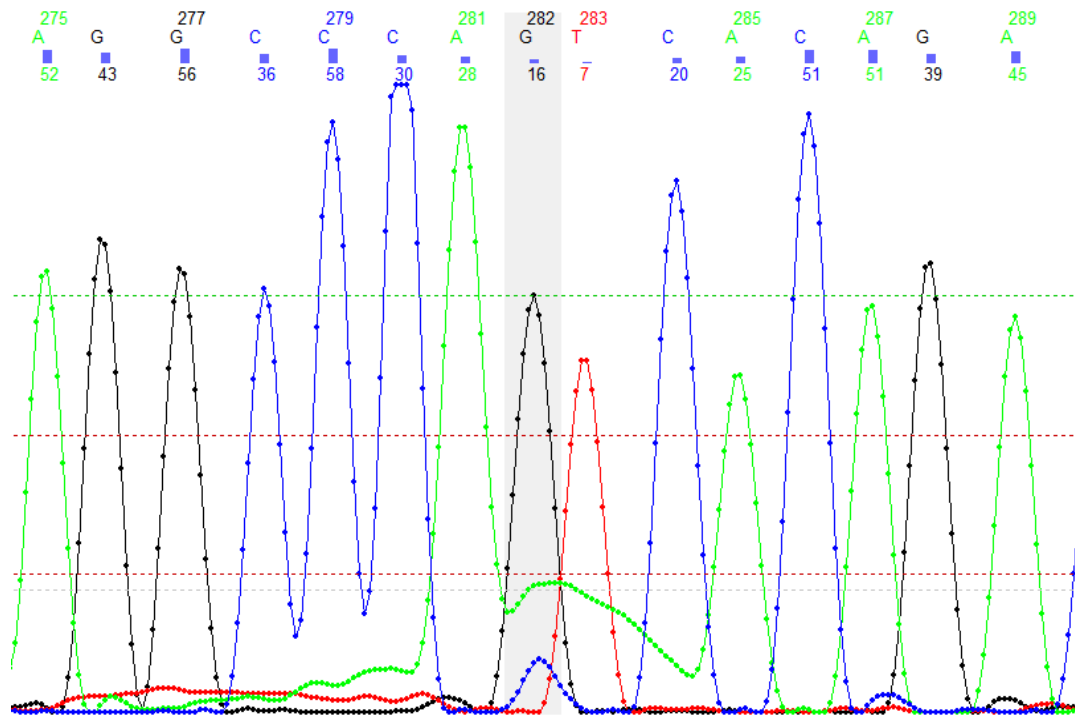


Рис. 3.2. Хроматограма результатів секвенування за Сенгером в інтерфейсі програми «HLA Fusion 6.0»

Аналогічна тенденція простежується також в позиції 311 (див. рис. 3.1 та рис. 3.3), де замість очікуваного гетерозиготного стану зафіксовано гомозиготний сигнал нуклеотиду цитозину (C). Відсутність червоного піку тиміну (T) в цій точці додатково підтверджує системний характер змін у структурі представленого локуса HLA-A. Оскільки інтенсивність флуоресценції альтернативного варіанта в даній позиції також не пододала поріг детекції програмного забезпечення «HLA Fusion 6.0», це призвело до автоматичного визначення позиції як гомозиготної. Сукупність ідентифікованих аномалій у кількох критичних точках другого екзону

(зокрема описаних вище – 282 та 311) свідчить про те, що втрата гаплотипу відбулася не точково, а охопила значну ділянку гена.

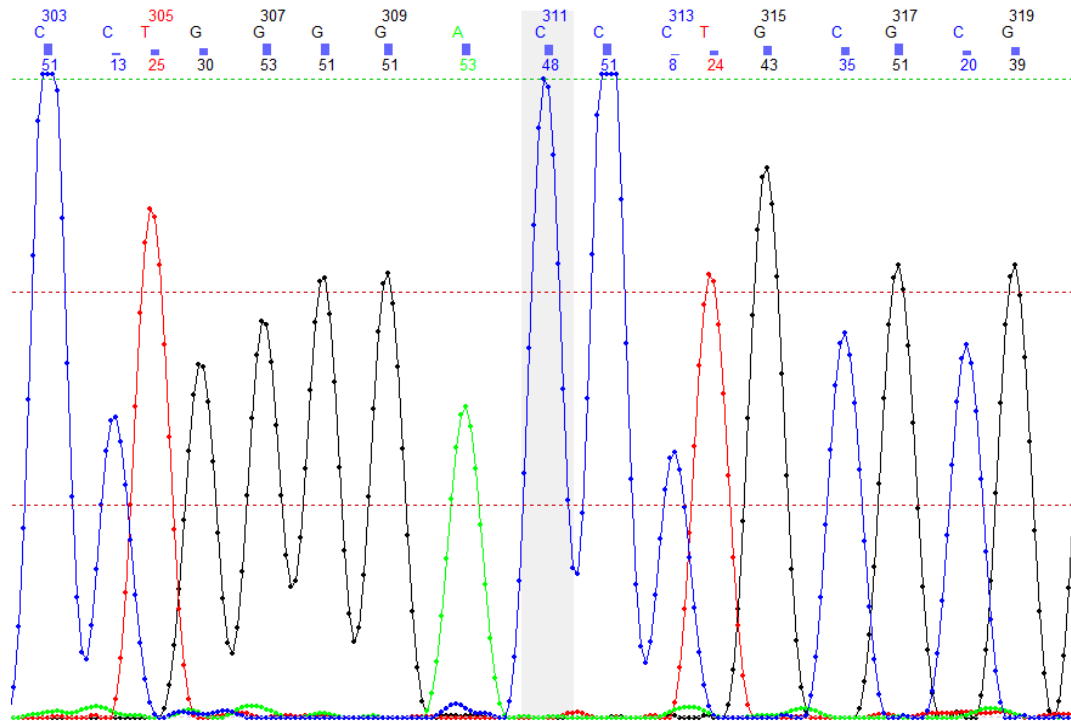


Рис. 3.3. Хроматограма результатів секвенування за Сенгером в інтерфейсі програми «HLA Fusion 6.0»

Таким чином, встановлено, що недосконалість вбудованого алгоритму біоінформатичного аналізу, заснованого на референтній послідовності, може призводити до інтерпретації результатів як умовної гомозиготності при збереженні гетерозиготного стану на молекулярному рівні, що, у свою чергу, зумовлює маскування реальної втрати гетерозиготності. Подібний ефект маскування мінорних алельних варіантів також спостерігається в інших досліджуваних локусах системи лейкоцитарного антигену людини даної пацієнтки.

Інтерпретація мінорних нуклеотидних варіантів як фонового шуму біоінформатичним алгоритмом свідчить про недостатню їхню амплітуду для надійної класифікації відповідної позиції як гетерозиготної. По-перше, це

може бути спричинене переважанням однієї популяції клітин, в даному випадку – саме високою часткою бластної популяції, і тоді – їхній продукт ампліфікації стає основним субстратом для реакції секвенування. По-друге, поріг чутливості даного методу є досить обмежений щодо мінорних варіантів, причому межа виявлення становить 15-20 % [81]. Якщо частка клітин, що несуть алель A*02:01 є нижчою за цей поріг, програмне забезпечення для аналізу результатів секвенування відсікає пік цитозину (C) як фоновий шум або неспецифічну флуоресценцію. Таким чином, метод секвенування за Сенгером не може забезпечити виявлення мінорних мінорних алельних форм через обмежену аналітичну чутливість, оскільки його біоінформатичні алгоритми не мають достатньої специфічності для диференціації слабого алельного сигналу від фонового шуму. В результаті цей метод показав обмеження у виявленні гетерозиготності, що потребувало додаткового підтвердження іншими методами.

Наступним кроком було проведення типування за локусами людського лейкоцитарного антигену методом секвенування наступного покоління, який характеризується масивним паралельним прочитанням нуклеотидів і значно вищою продуктивністю порівняно з секвенуванням за Сенгером. На рис. 3.4 представлено візуалізацію результатів NGS-типування ділянки другого екзону. При аналізі зразка біоінформатичний алгоритм ідентифікував два донорські алелі – A*02:01 та A*03:01. Спостерігається значний дисбаланс у розподілі зчитаних фрагментів (reads), зокрема вищезгаданої позиції 282. Для спільного з донором алеля A*03:01 частота нуклеотиду G становить 98,87 % або 436 прочитань, що свідчить про майже абсолютне домінування в даній позиції. Водночас інший алель від донора A*02:01 представлений як варіант із високим фоновим шумом (high background). Натомість, унікальний алель пацієнтки A*24:02 взагалі не був детектований як компонент визначеного генотипу.

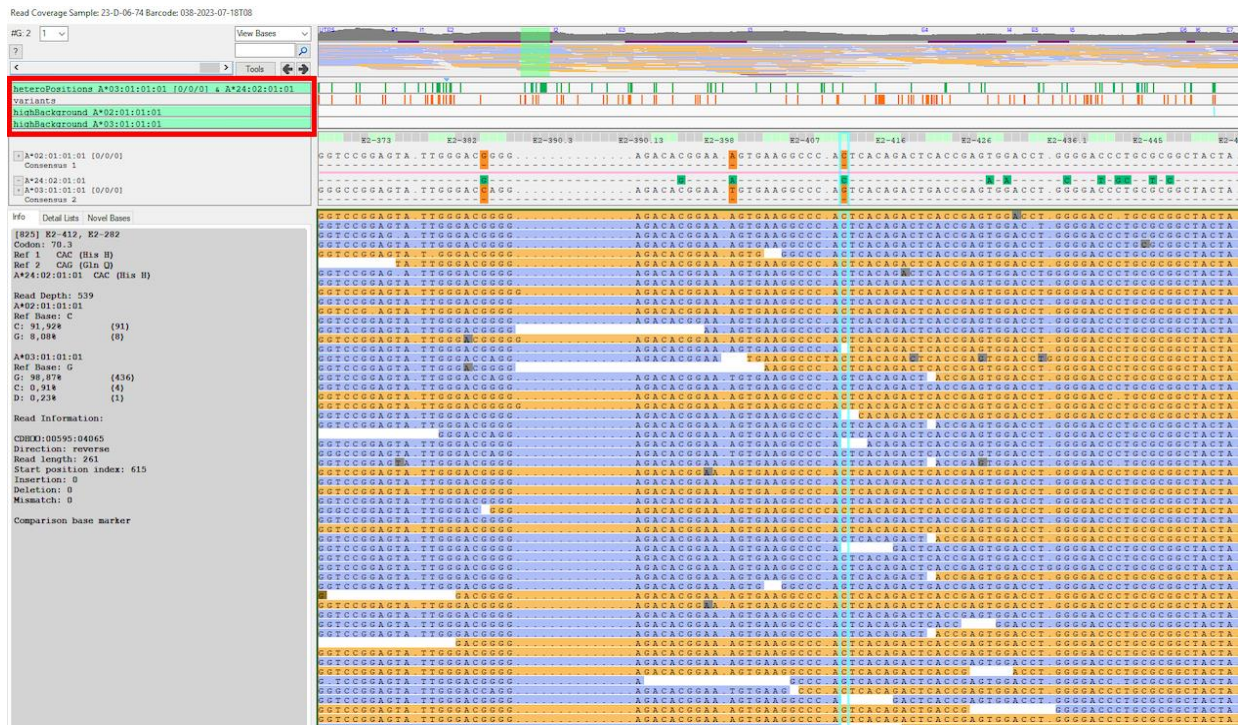


Рис. 3.4. Вирівнювання послідовностей алелів результатів секвенування нового покоління в інтерфейсі програми «TypeStream Visual 3.1»

Результати, отримані в ході аналізу даних NGS, підтвердили тенденцію, виявлену при секвенуванні за Сенгером. Незважаючи на здатність даного методу детектувати мінорні позиції, у даному випадку висока частка бластної популяції призвела до алельного дисбалансу: більшість прочитань походить від ДНК саме злякисних клітин, які зберегли лише гаплотип із алелем A*03:01. Це створює хибну інтерпретацію гомозиготності за даним алелем. Також, оскільки частка клітин, що несуть алель A*02:01, є критично низькою, програмне забезпечення «TypeStream Visual 3.1» класифікує поодинокі сигнали як фоновий шум або артефакт, не включаючи їх до фінального звіту про генотип зразку. Таким чином, другий метод з високою роздільною здатністю не дозволив зафіксувати повноцінну втрату гетерозиготності, оскільки алгоритми NGS орієнтовані насамперед на якісне визначення нуклеотидної послідовності і тому, присутність донорських алелів у зразку призвела до маскування втрати гетерозиготності, повторивши ситуацію із унеможливленням виявлення цього явища після настання рецидиву.

Отримані результати зумовили необхідність перевірки зразка наступним методом – SSP, який, на відміну від якісного аналізу послідовності, забезпечує можливість побачити ампліфікацію всіх наявних варіантів алелей у зразку завдяки принципу прямої бінарної детекції. Важливою перевагою SSP є його висока аналітична чутливість: навіть за умови домінування донорського генотипу в зразку, метод дозволяє ідентифікувати специфічні алелі реципієнта, якщо частка цих клітин в загальному пулі ДНК становить принаймні 6 %. Це дозволяє візуалізувати ампліфікацію всіх наявних алельних варіантів, що забезпечує значно вищу чутливість до детекції залишкових популяцій клітин пацієнта порівняно з традиційним секвенуванням [82].

За допомогою третього методу з низькою роздільною здатністю, на електрофореграмі вдалося побачити відсутність специфічних смуг з ампліфікацією продукту в лунках, які відповідають втраченим унікальним алелям пацієнтки локусів HLA I класу: A*24:02, B*35:03, C*04:01 (рис. 3.5). Оскільки поріг чутливості методу був значно нижчим за поточну частку бластних клітин у зразку, відсутність відповідних смуг стала остаточним підтвердженням повної втрати даного гаплотипу завдяки механізму маскування злоякісним клоном.

Окремої уваги при аналізі результатів гель-детекції потребує зафіксований позитивний сигнал у 78-й лунці (рис. 3.5, виділено зеленою стрілкою), яка фактично відповідає алелю B*35:03. Згідно з технічною специфікацією праймерів в комерційних наборах SSP та даними програмного забезпечення «HLA Fusion 4.6.1», дана лунка характеризується перехресною реактивністю до певних алелів групи B*07:02, один з яких був присутній у генотипі реципієнта. Таким чином, ампліфікація в цій позиції свідчить не про збереження пацієнтського алеля B*35:03, а є результатом детекції донорського або спільного варіанта B*07:02. Дане явище можна пояснити кількома факторами, зокрема використанням у комерційних наборах SSP праймерів з широкою специфічністю, тобто націлених на консервативні нуклеотидні

послідовності, в даному випадку, характерних як для В*35:03, так і для деяких алелів групи В*07:02.

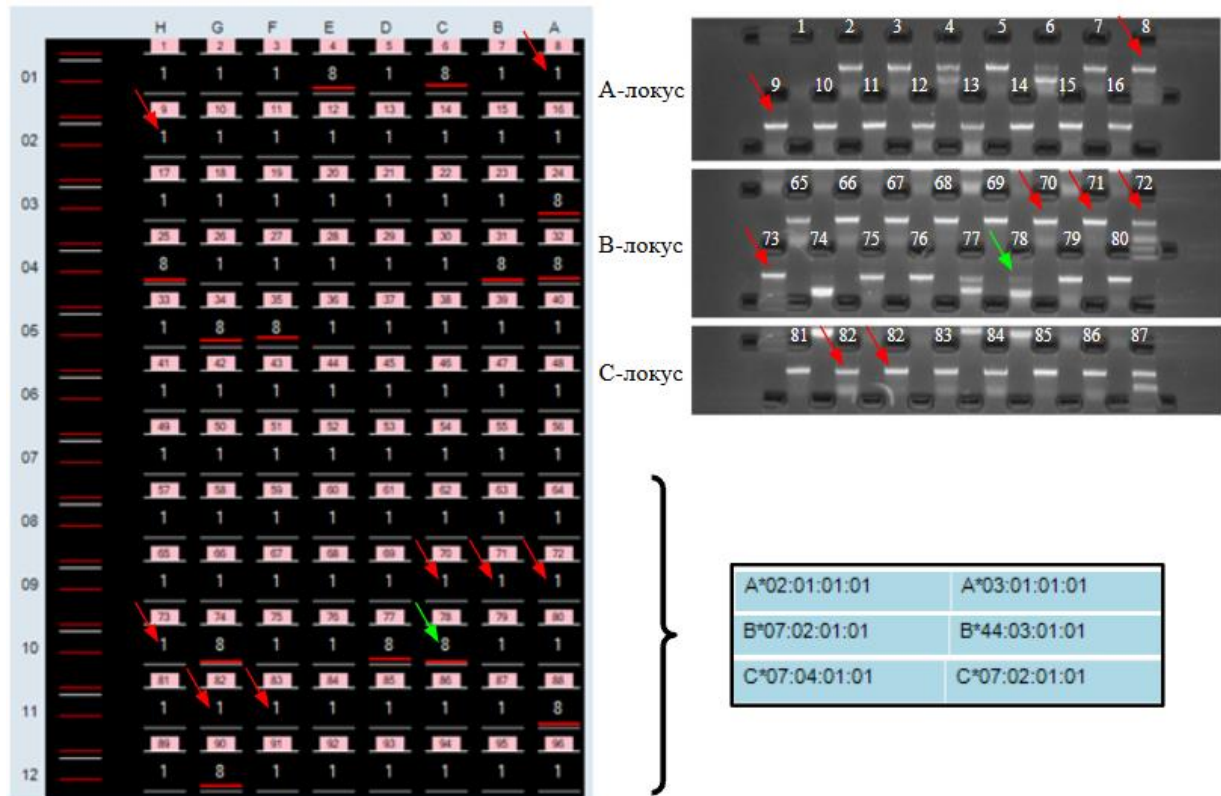


Рис. 3.5. Гель-детекція продуктів ампліфікації локусів HLA класу I (зліва – в інтерфейсі програми «HLA Fusion 4.6.1», справа – електрофореграма розділення)

Оскільки алель В*07:02 був присутній у зразку як донорський або спільний варіант (див. табл. 3.1), позитивний сигнал у цій точці є очікуваною реакцією на даний варіант. Таким чином, наявність амплікону в даній лунці свідчить не про збереження алеля В*35:03, а про детекцію іншого алеля з подібною нуклеотидною послідовністю, що технічно може імітувати присутність втраченого алеля.

Аналогічна картина спостерігалася і при аналізі локусів HLA II класу. На отриманій електрофореграмі (рис. 3.6) було зафіксовано відсутність ампліфікації специфічних ділянок, що відповідають унікальним алелям пацієнтки – DRB1*12:01 і DQB1*03:01.

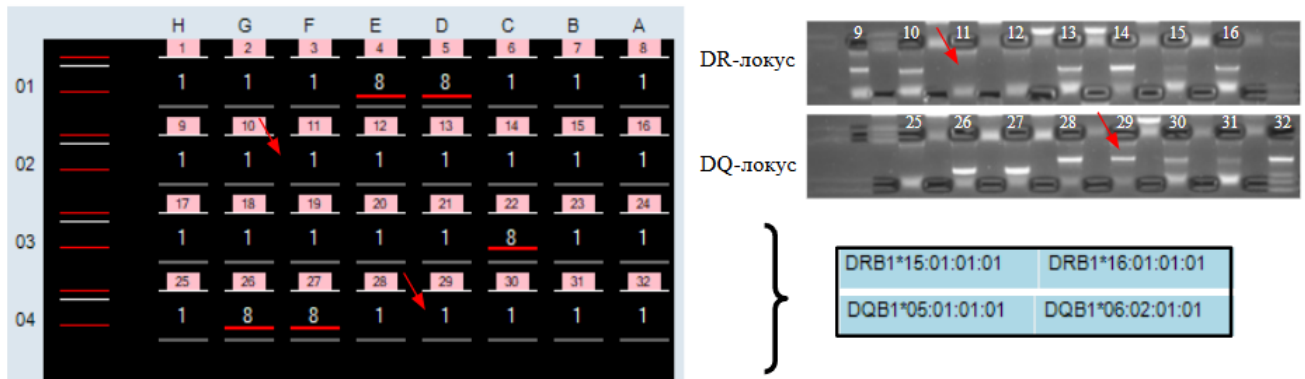


Рис. 3.6. Гель-детекція продуктів ампліфікації локусів HLA класу II (зліва – в інтерфейсі програми «HLA Fusion 4.6.1», справа – електрофореграма розділення)

Завдяки використанню специфічних праймерів, реакція дає одразу зрозуміти чи присутній продукт ампліфікації в лунках, що відповідають шуканим алелям. На відміну від методів високої роздільної здатності, де слабкий сигнал від втраченого алеля нівелюється переважаючою ДНК бластного клону, у SSP відсутність ампліфікації при збереженні позитивного внутрішнього контролю є прямим і однозначним доказом делеції відповідного HLA-антигену. Тому, саме цей метод виявився найбільш ефективним для детекції такого механізму імунної втечі пухлини, як втрата гетерозиготності.

Найбільшим недоліком цього методу є неможливість фазування гетерозиготних послідовностей (комбінацій багатьох пар алелів HLA), і тому в багатьох випадках «неоднозначність» генотипування HLA залишається проблемою. Типування HLA за допомогою секвенування Сенгера вимагає кількох раундів додаткового тестування для забезпечення високого рівня роздільної здатності, що збільшує час обробки зразка. Також метод Сенгера включає низьку якість перших основ послідовності через зв'язування праймерів та погіршення якості слідів секвенування після 700-900 основ, і тому він може секвенувати обмежену довжину зчитування [79].

Варто зауважити, що секвенування нового покоління (NGS) також стикається з аналогічними викликами. Зокрема, при використанні коротких

зчитувань (short-reads) проблема фазування алелів залишається актуальною, оскільки біоінформатичні алгоритми не завжди здатні точно інтерпретувати правильні генотипи [83]. Зрештою, як секвенування Сенгера, так і секвенування нового покоління мають нижчу чутливість у виявленні мінорних алелів, ніж метод ПЛР-SSP.

3.2. Методологічні підходи до детекції трьох алелей генів HLA у пацієнтів після аlogenної ТГСК

Чоловік, 51 рік. У 2023 році було діагностовано гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ). У липні 2024 року пацієнт отримав аlogenну трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин, а саме гаплоідентичну ТГСК від родинного донора – сина. У ході посттрансплантаційного моніторингу на день +106 було зафіксовано рецидив основного онкогематологічного захворювання. У досліджуваних зразках периферичної крові пацієнта було ідентифіковано три різні алельні варіанти генів людського лейкоцитарного антигену: два з них відповідали вихідному генотипу самого реципієнта, а третій – гаплотипу донора, що зумовило формування складної генетичної картини змішаного вмісту ДНК у зразку.

Згідно з даними узагальнених результатів HLA-типування пацієнта і донора в табл. 3.2, імуногенетичний аналіз зразка пацієнта на момент зафіксованого рецидиву не виявив ознак втрати гетерозиготності за основними локусами HLA. Це свідчить про збереження повного генотипу реципієнта на фоні часткової присутності донорської ДНК в зразку.

Особливість даного випадку полягає в одночасній присутності у зразку повного донорського гаплотипу та унікального гаплотипу реципієнта (алелі A*11:01, B*15:01, C*04:01, DRB1*07:01, DQB1*02:02), маркованого червоним кольором в табл. 3.2. Тобто, ключовою особливістю даного клінічного випадку є те, що, незважаючи на розвиток рецидиву основного онкогематологічного

захворювання, його причиною не була втрата гетерозиготності за основними локусами HLA.

Таблиця 3.2

Узагальнені результати HLA-типуювання реципієнта і донора за досліджуваними локусами

Локус	HLA-типуювання донора	HLA-типуювання реципієнта перед ало-ТГСК	HLA-типуювання реципієнта після ало-ТГСК
HLA-A*	02:01 ; 11:01	02:01 ; 31:01	02:01 ; 11:01 ; 31:01
HLA-B*	15:01 ; 27:05	27:05 ; 39:01	15:01 ; 27:05 ; 39:01
HLA-C*	02:02 ; 04:01	02:02 ; 39:01	02:02 ; 04:01 ; 12:03
HLA-DRB1*	01:01 ; 07:01	01:01 ; 13:01	01:01 ; 07:01 ; 13:01
HLA-DQB1*	02:02 ; 05:01	05:01 ; 06:03	02:02 ; 05:01 ; 06:03

Примітка: червоним кольором виділено HLA-алелі донора, що були ідентифіковані в біологічному матеріалі реципієнта після ало-ТГСК

Основним завданням було визначення частки клітин реципієнта, що збереглися, за допомогою молекулярно-генетичних методів різної роздільної здатності. Як і в попередньому клінічному випадку, це явище було підтверджено методом SSP, але майже не спостерігалось при використанні методів NGS та SBT.

На рис. 3.7 відображено бібліотеку з порівняльним вирівнюванням референсних нуклеотидних послідовностей різних алелей. У даному випадку представлено послідовності алелей локусу HLA-A донора (A*02:01 і A*31:01) та пацієнта (A*11:01) (рис. 3.7) за допомогою секвенування за Сенгером.

Вирівнювання демонструє численні поліморфні заміни, що дозволяють визначити, як два, так і три різні нуклеотидні варіанти. Наприклад, в позиції 97 алель 02:01 має нуклеотид тимін (T), тоді як 31:01 – аденін (A), і програмне забезпечення фіксує обидва піки. В деяких інших позиціях ситуація ще складніша, зокрема, у позиціях 98, 256 та 257 другого екзону, що показані на виділених фрагментах рис. 3.7, спостерігаються три різні нуклеотиди для кожного алеля, що створює передумови для появи складних гетерозиготних сигналів на хроматограмах. Хоча програма визначає всі три піки, але не інтерпретує їх коректно як триалелізм.

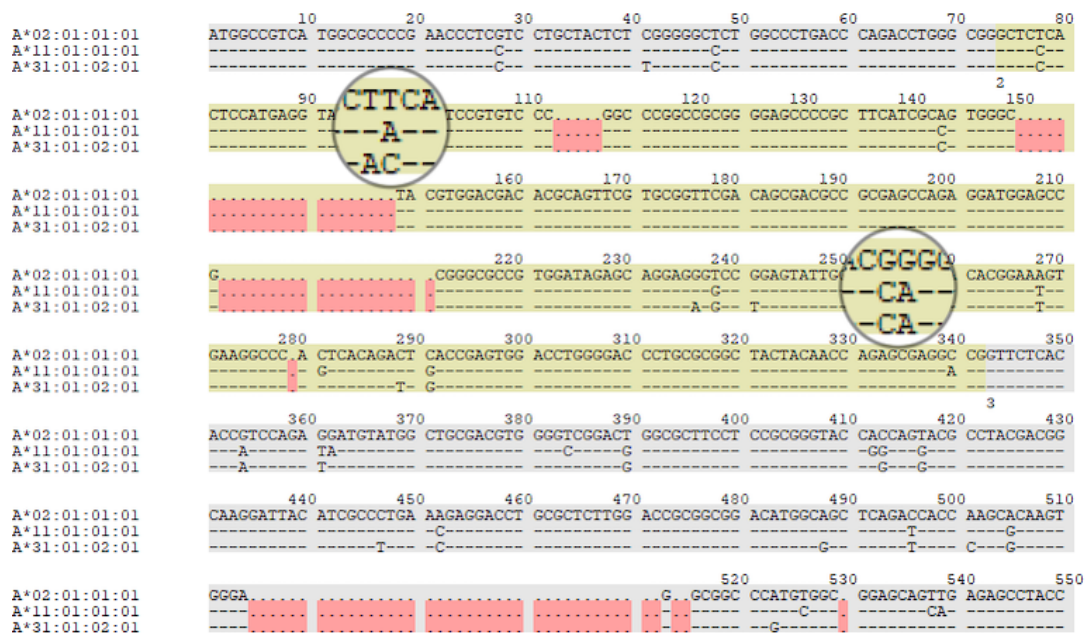


Рис. 3.7. Вирівнювання послідовностей алелів результатів секвенування за Сенгером в інтерфейсі програми «HLA Fusion 6.0»

Під час біоінформатичного аналізу результатів секвенування за Сенгером зразка даного пацієнта спостерігалось накладання трьох флуоресцентних піків вздовж усєї довжини отриманої хроматограми. В обраних репрезентативних ділянках, зокрема в позиції 98 (перша виділена ділянка на рис. 3.7) візуалізуються три піки різного кольору, що відповідають нуклеотидам тиміну (алель 02:01), аденіну (алель 11:01) і цитозину (алель 31:01) (рис. 3.8). З одного

боку, це підтверджує присутність трьох алельних варіантів у зразку, а, з іншого боку, – робить технічно неможливим отримання достовірного результату типування високої роздільної здатності. Накладання трьох флуоресцентних сигналів унеможлиблює однозначно інтерпретувати хроматограму зі складною сумішшю піків, які належать різним алелям, алгоритмом програмного забезпечення.

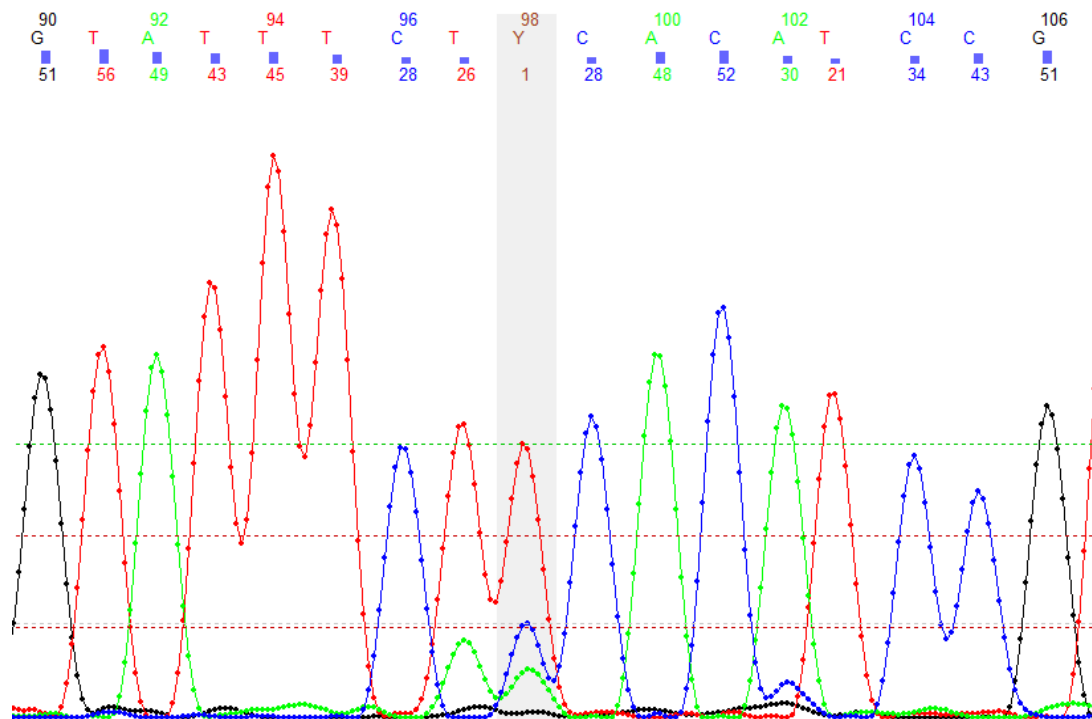


Рис. 3.8. Хроматограма результатів секвенування за Сенгером в інтерфейсі програми «HLA Fusion 6.0»

Аналогічна картина спостерігається на наступному фрагменті з варіабельними нуклеотидами позицій 256 та 257 (рис. 3.9), де накладання сигналів від донорських алелів та алеля реципієнта створює специфічний шумовий профіль, який програмне забезпечення ідентифікує як множинну гетерозиготність. Оскільки біоформатичний алгоритм не зміг коректно ідентифікувати правильні нуклеотиди, було проведено вирівнювання вручну, однак навіть це не дозволило отримати очікуваний результат – наявність

змішаного генотипу з трьох алелів не було розпізнано. Присутність трьох піків у гомологічних позиціях є доказом того, що в досліджуваному зразку присутня значна частка ДНК реципієнта. На відміну від попереднього випадку, де домінуючий бластний клон маскував мінорні сигнали, тут концентрація клітин пацієнта достатня для того, щоб метод секвенування за Сенгером зареєстрував їх як валідні сигнали, що виходять за межі фонового шуму.

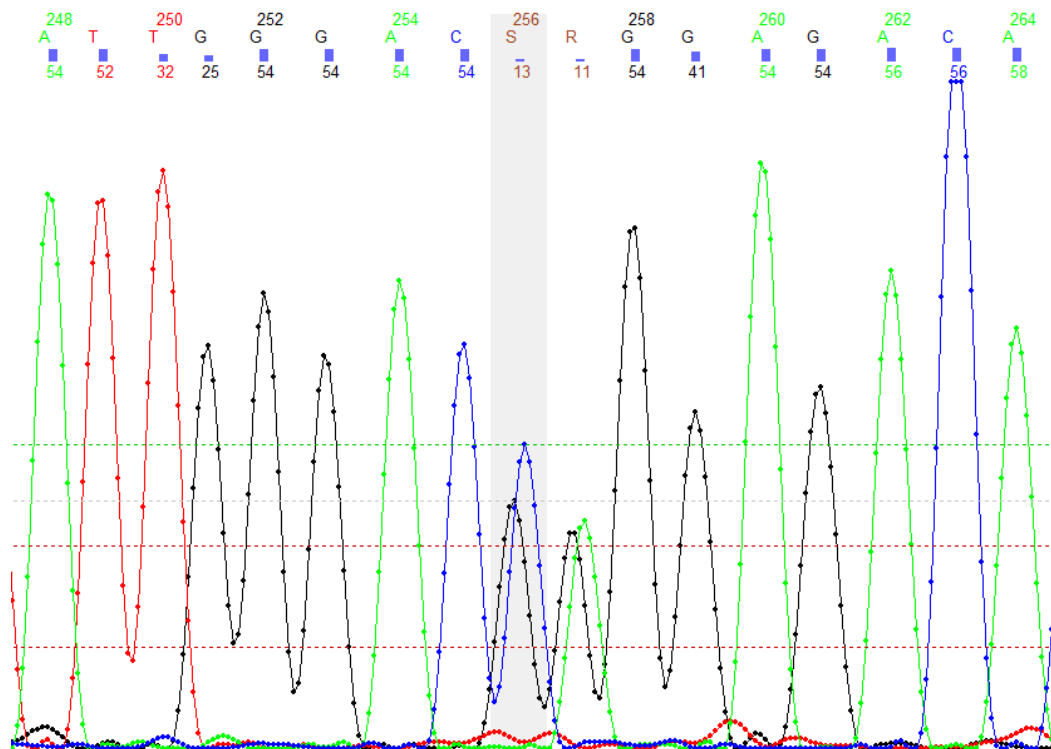


Рис. 3.9. Хроматограма результатів секвенування за Сенгером в інтерфейсі програми «HLA Fusion 6.0»

Подібна ситуація спостерігалася і при використанні методу NGS: програмне забезпечення не змогло визначити наявність трьох алелів у пацієнта. У зразку було ідентифіковано лише два донорські алелі – A*02:01 та A*31:01 (виділено червоним на рис. 3.10). Одночасно з тим, обидва алелі мають статус високого фонового шуму (high background), що вказує на наявність значної кількості сторонніх нуклеотидних сигналів. На прикладі досліджуваної позиції 98 в другому екзоні проаналізовано розподіл прочитань

для кожного нуклеотиду. Для першого донорського алеля частота Т становить 94,78 % (254 reads), проте фіксується 4,48 % нуклеотиду А, який належить реципієнтському алелю А*11:01. Так само, для другого донорського алеля фіксується 86,10 % нуклеотиду С, тоді як А складає всього 12,83 %. Попри фізичну присутність прочитань, що несуть інформацію про алель реципієнта, програмне забезпечення не змогло об'єднати ці мінорні сигнали у повноцінний третій гаплотип, адже бере до уваги алелі, що мають найвищу інтенсивність або найкраще відповідають референсу. Система розцінила ці невеликі відсотки аденіну як фоновий шум, розподіливши їх між двома основними донорськими алелями.

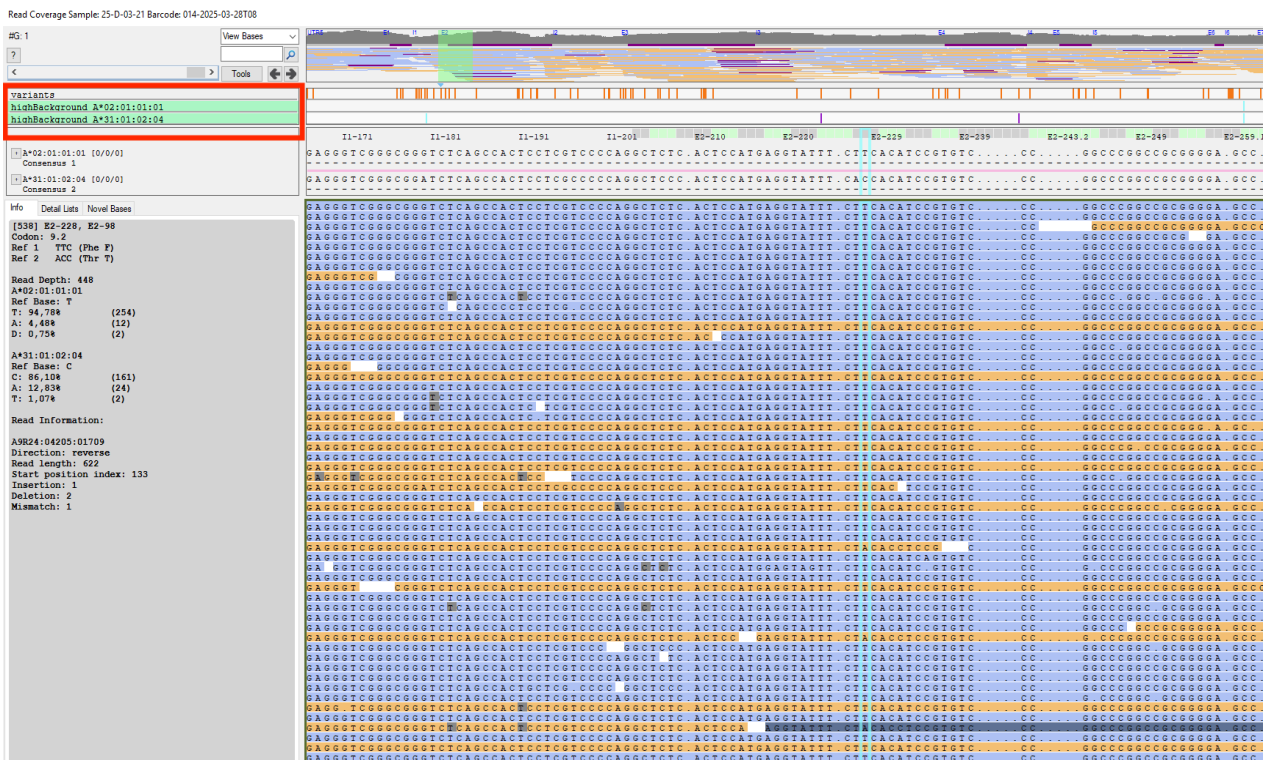


Рис. 3.10. Вирівнювання послідовностей алелів методом секвенування нового покоління в інтерфейсі програми «TypeStream Visual 3.1»

Це призвело до того, що унікальний генетичний профіль пацієнта залишився неідентифікованим у фінальному звіті, попри його фактичну реєстрацію на рівні «сирих» даних, що ще раз підтверджує обмеженість

секвенування нового покоління у детекції складних випадків, як присутність трьох алелів у генотипі пацієнта.

Хоча даний метод має надвисоку чутливість, але все-таки залишається з обмеженим алгоритмом інтерпретації даних. Таким чином, через значний алельний дисбаланс, метод NGS-секвенування у даному випадку підтвердив наявність наявності трьох алельних варіантів, спричиненого присутністю генетичного матеріалу як донора, так і реципієнта. Через високий рівень фонового шуму в цільових локусах, програмний алгоритм не зміг повноцінно ідентифікувати третій алель в генотипі пацієнта, що призвело до неоднозначного результату HLA-типування. Це ще раз доводить необхідність використання методу SSP у подібних випадках.

Остаточне підтвердження наявності трьох алелів у кожному локусі було отримано саме за допомогою методу SSP, який володіє найвищою чутливістю до присутності специфічних послідовностей залежно від їхньої відносної концентрації у зразку [84]. Для візуалізації результатів використано пряму детекцію у гелі (рис. 3.11), оскільки програмне забезпечення «HLA Fusion 4.6.1» технічно не передбачає відображення трьох алелів одночасно. Хоча програма коректно ідентифікує ці алелі при почерговому оцінюванні індивідуальних зразків донора та пацієнта, при аналізі суміші алгоритм видає неоднозначний результат, обмежуючи інтерпретацію лише двома варіантами.

На отриманій електрофореграмі видно позитивні сигнали для кожного алеля пацієнта, що свідчить про формування триалельного профілю внаслідок об'єднання генотипів донора і реципієнта (рис. 3.11). У позначених лунках відбулася успішна ампліфікація продуктів, що відповідають унікальним алелям реципієнта. За умови повного приживлення донорського трансплантату після алогенної ТГСК ці додаткові смуги мали б бути відсутніми, проте специфічність методу SSP до детекції дозволила однозначно виявити наявність ДНК пацієнта у зразку, підтвердивши стан змішаного химеризму.

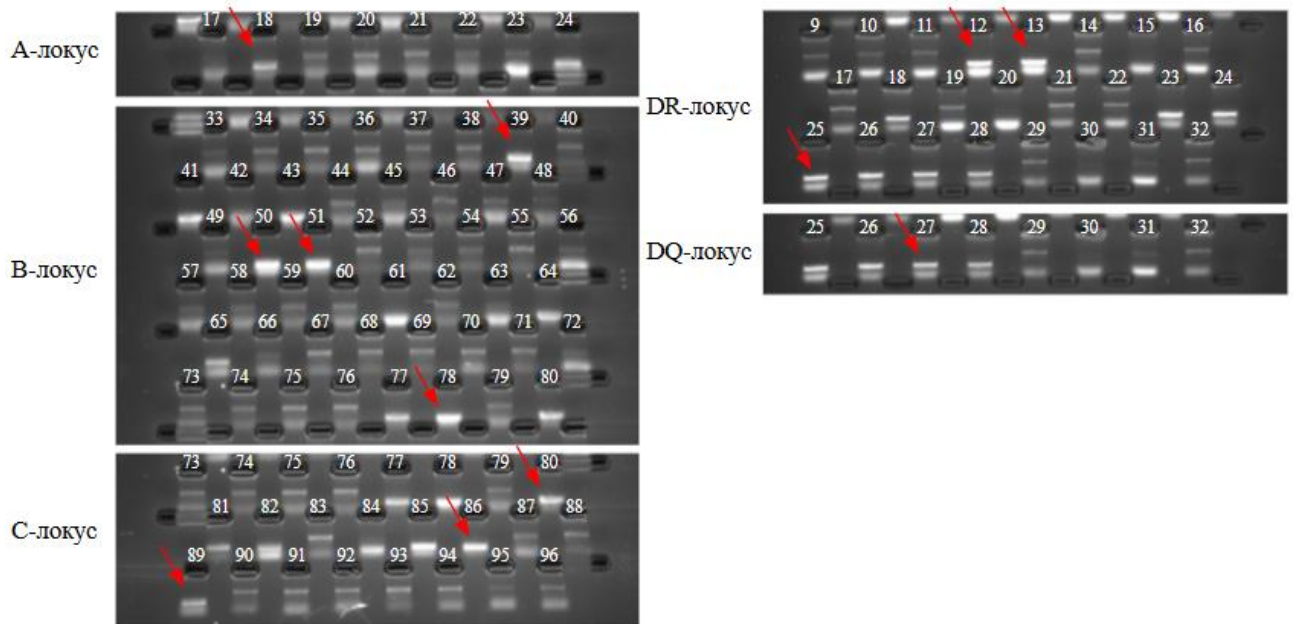


Рис. 3.11. Гель-детекція продуктів ампліфікації локусів НЛА при виявленні трьох алельних варіантів в одному зразку периферичної крові

Таким чином, у даному випадку спостерігається ситуація, протилежна попередньому клінічному випадку: якщо при втраті гетерозиготності за локусами людського лейкоцитарного антигену основна проблема діагностики полягала у недостатній аналітичній чутливості методів секвенування до мінорних алельних варіантів, присутніх у зразку ДНК в низькій концентрації, що призвело до хибної інтерпретації результатів типування, то при появі третього алеля вона зумовлена надлишковістю сигналу, яку біоінформатичні алгоритми, задіяні в аналізі методів високої роздільної здатності не здатні коректно інтерпретувати.

В обох випадках саме метод SSP виявився найбільш надійним інструментом ідентифікації специфічних алелів: у першому випадку – завдяки здатності детектувати мінімальні концентрації ДНК реципієнта у загальному пулі ДНК зразка, а в другому – завдяки можливості диференціації ампліконів, що відповідають кожному алелю, присутньому в ДНК зразка.

3.3. Дотрансплантаційна втрата одного з батьківських HLA-гаплотипів при рецидиві гострого лімфобластного лейкозу

Дівчинка, 6 років. У січні 2024 року діагностовано гострий лімфобластний лейкоз з надраннім рецидивом. На відміну від попередніх представлених випадків, у реципієнта сталося повернення основного онкогематологічного захворювання без попередньої трансплантації, що поставило під сумнів результати стандартних методів HLA-типування. Результати порівняльного аналізу гаплотипів пацієнтки та її батьків представлено в табл. 3.3, де червоним кольором виділені втрачені алелі пацієнтки, що присутні в гаплотипі матері.

Таблиця 3.3

Узагальнені результати HLA-типування реципієнта і донорів за досліджуваними локусами

Локус	HLA-типування матері	HLA-типування батька	HLA-типування реципієнта
HLA-A*	01:01 ; -	11:01 ; 30:01	11:01 ; -
HLA-B*	08:01 ; -	13:02 ; 56:01	56:01 ; -
HLA-C*	07:01 ; -	01:02 ; 06:02	01:02 ; 07:01
HLA-DRB1*	03:01 ; -	01:01 ; 07:01	01:01 ; 03:01
HLA-DQB1*	02:01 ; 02:52	02:02 ; 05:01	02:52 ; 05:01

Примітка: червоним кольором виділено втрачені HLA-алелі реципієнта з материнського гаплотипу

За результатами аналізу секвенування нового покоління (рис. 3.12) отримано генотип пацієнтки, де червоним виділено локуси, в яких програмне забезпечення ідентифікувало стан гомозиготності. А саме, для локусів HLA-A, HLA-B та HLA-DRB1 система зафіксувала ідентичні алелі 11:01, 56:01 та 01:01 відповідно, в обох позиціях.

Locus	Allele 1	[K/N/I] 1	Notes 1	Allele 2	[K/N/I] 2	Notes 2	System Comments	Final Assignment	Coverage
A	A*11:01:01 [+]	[0/0/1]	NEW	A*11:01:01 [+]	[0/0/1]	NEW	Locus assignment is homoz...		
B	B*56:01:01 [+]	[0/0/1*]	NEW	B*56:01:01:03	[0/0/0*]		1 low variant (<0.10), 0 are...		
C	C*01:02:01 [+]	[0/0/0]		C*07:01:01 [+]	[0/0/1*]	NEW	22 low variant (<0.10), 10...		
DRB1	DRB1*01:01:01 [+]	[0/0/0]	Low Coverage	DRB1*01:01:01 [+]	[0/0/0]	Low Coverage	Locus assignment is homoz...		
DRB345	DRB3*01 [+]	[0/0/0*]		DRB3*01 [+]	[0/0/0*]		High Background position(s...		
DQA1	DQA1*01:01:01	[0/0/1]	NEW	DQA1*05 [+]	[0/6/25]	NEW & Low...	290 low variant (<0.10), 9...		
DQB1	DQB1*02:52	[0/0/0*]		DQB1*05:01:01 [+]	[0/0/0]		38 low variant (<0.10), 38...		
DQB1	DQB1*05:01:01 [+]	[0/0/0]		DQB1*05:01:01 [+]	[0/0/0]		Locus assignment is homoz...		
DPA1	DPA1*02:01:04	[0/0/0]		DPA1*02:01:04	[0/0/0]		Locus assignment is homoz...		
DPB1	DPB1*13:01:01 [+]	[0/0/0]	Low Coverage	DPB1*13:01:01 [+]	[0/0/0]	Low Coverage	Locus assignment is homoz...		

Рис. 3.12. Візуалізація результатів методу секвенування нового покоління в інтерфейсі програми «TypeStream Visual 3.1»

Згідно з результатами генотипування родини пацієнтки (табл. 3.3.), вона мала бути гетерозиготною за всіма локусами, успадкувавши один гаплотип від батька, а інший – від матері. Проте аналіз зразка на момент рецидиву та бластного кризу виявив іншу генетичну картину. Відбулася часткова втрата материнського гаплотипу і, відповідно, стан за трьома локусами виглядає хибно гомозиготним. Водночас у локусах HLA-C та HLA-DQB1 гетерозиготність збережена. Така селективна втрата алелів свідчить про перебудову геному бластних клітин, що дозволило їм уникнути розпізнавання імунною системою реципієнта.

Особливий інтерес викликає локус HLA-B, де програма також фіксує гомозиготний стан, але вказує на реєстрацію поодиноких зчитувань від мінорної популяції нормальних клітин, навіть попри домінування бластного клону зі зміненим генотипом. Однак, через їхню критично низьку концентрацію

(менше 10 %), програма не здатна детектувати їх як повноцінний другий алель, що призводить до визначення гомозиготності [83]. Це хибно інтерпретується як природний гомозиготний генотип за батьківським типом, адже навіть висока якість секвенування («coverage») вказує на біологічну природу даного явища. Аналогічно методу NGS, традиційний метод SSP, який у попередніх кейсах продемонстрував високу чутливість до детекції втрати гетерозиготності та присутності трьох алелів у зразку, в даному конкретному випадку не зміг ідентифікувати материнський гаплотип.

Порівнюючи з попередніми розглянутими клінічними діагностичними випадками, можна сказати, що поріг чутливості детекції втрати гетерозиготності методом SSP залежить не лише від частки бластів у загальному пулі ДНК зразка, але й від наявності референтного генотипу при дослідженні. Оскільки відсутність ампліфікації специфічних алелів може бути помилково інтерпретована як природна гомозиготність, виникає критична потреба у верифікації конститутивного генотипу пацієнта. У ситуаціях, коли сімейне генотипування батьків або сиблінгів є неможливим, єдиним надійним способом диференціації істинної гомозиготності від соматичної втрати алеля в злоякісних клітинах є повторне дослідження альтернативного біологічного матеріалу. Зокрема, забір букального епітелію дозволяє отримати вихідну ДНК, позбавлену генетичного матеріалу лейкомічних клітин, що є обов'язковим етапом для коректної інтерпретації результатів HLA-типуювання під час бластного кризу.

У даному випадку, негативний результат ампліфікації материнських алелів помилково інтерпретується як природна гомозиготність, що робить сімейний порівняльний аналіз генотипів єдиним методом визначення гомозиготності в таких умовах. Попереднє типуювання обох батьків дозволило чітко визначити гаплотипи, які пацієнтка мала успадкувати за законами успадкування в нормі, і дало змогу ідентифікувати факт втрати частини генотипу одного з батьків.

Таким чином, при первинному рецидиві без проведення попередньої алогенної ТГСК обидва застосовані молекулярно-генетичні методи різної роздільної здатності (NGS та SSP) виявилися недостатньо ефективними для виявлення соматичних змін в локусах HLA. За таких умов саме сімейний метод став єдиним надійним інструментом виявлення генетичних змін, оскільки лише порівняння з конститутивними гаплотипами батьків дозволило підтвердити факт вторинної перебудови геному бластних клітин та ідентифікувати втрату материнської алельної групи.

3.4. Переваги методу низької роздільної здатності при виявленні втрати гетерозиготності за генами HLA

Отримані результати дослідження демонструють суттєві обмеження сучасних методів молекулярно-генетичного типування високої роздільної здатності, як секвенування за Сенгером та секвенування нового покоління у пацієнтів із перед- і посттрансплантаційними рецидивами онкогематологічних захворювань. Попри високу чутливість і специфічність, ці методи стикаються зі значними обмеженнями при ідентифікації складних генетичних змін внаслідок механізмів імунної втечі злоякісних клітин, таких як втрата гетерозиготності. Це особливо актуально для алелів, що мають мінімальні нуклеотидні відмінності, де програмні алгоритми не здатні чітко диференціювати мінорний сигнал від фонового шуму. У таких умовах наявність істинної втрати гетерозиготності не може бути повністю підтверджена або виключена лише на основі автоматизованого секвенування, що створює перешкоди при підборі стратегії подальшого лікування чи пошуку альтернативного донора [78, 79].

Головна перевага методів низької роздільної здатності, зокрема SSP, полягає у їхній подвійній природі детекції – наявності або відсутності специфічного амплікону. На молекулярному рівні розвиток рецидиву часто

супроводжується адаптивною еволюцією злоякісного клону: під імунним тиском трансплантата відбувається його селекція із втратою певної ділянки хромосоми. Фізична втрата гаплотипу реципієнта призводить до імунного маскування, оскільки Т-клітини донора втрачають мішені для розпізнавання. Метод SSP, працюючи за принципом прямої візуалізації конкретних алельних маркерів, дозволяє зафіксувати це зникнення або, навпаки, виявити мінорну присутність алеля, яку алгоритми методів високої роздільної здатності SBT та NGS не можуть однозначно інтерпретувати [71, 79].

Як продемонстрував аналіз описаних клінічних випадків, висока роздільна здатність не є абсолютною гарантією виявлення специфічних у діагностиці генетичних аномалій. При стандартних алгоритмах аналізу «сирі» дані секвенування часто маскують триалельні стани або втрату гетерозиготності під виглядом природної гомозиготності. Помилкова інтерпретація таких результатів може стати критичною для пацієнтів – спровокувати неефективну інфузію донорських лімфоцитів (DLI) або помилки при повторній аlogenній ТГСК від того самого донора [63, 84].

Для подолання технологічних лімітів та отримання точного генотипу в умовах значного бластного кризу необхідно дотримуватися комплексного підходу. Верифікація результатів має включати не лише ручну інтерпретацію, а й обов'язкове залучення альтернативних джерел ДНК, наприклад, букального епітелію. Це дозволяє встановити конститутивний або вроджений генотип, який не піддається соматичним мутаціям при злоякісних пухлинах. Тільки зіставлення даних високої роздільної здатності з контрольним типуванням низької роздільної здатності, а в деяких випадках і сімейним аналізом, гарантує виявлення механізмів імунного маскування пухлини та забезпечує вибір ефективного родинного донора для досягнення стійкої ремісії.

ВИСНОВКИ

Таким чином, у роботі було проведено порівняння методів HLA-типуювання для детекції втрати гетерозиготності при рецидивах онкогематологічних захворювань. Отримані результати дозволяють оптимізувати діагностику виявлення втрати гетерозиготності та сприяти підвищенню успішності лікування пацієнтів із рецидивами онкогематологічних захворювань.

1. Проведено молекулярно-генетичне типуювання людського лейкоцитарного антигену (HLA) пацієнтів із рецидивом основного онкогематологічного захворювання за допомогою методів різної роздільної здатності: ПЛР із праймерами, специфічними до послідовності (SSP), секвенування за Сенгером (SBT) та секвенування нового покоління (NGS).

2. Встановлено, що найвищу аналітичну чутливість при детекції втрати гетерозиготності в локусах HLA демонстрував метод SSP. На відміну від SBT та NGS, він дозволяв чітко візуалізувати відсутність чи наявність специфічних алелів за рахунок прямої детекції ампліконів у гелі.

3. Показано, що програмне забезпечення методів високої роздільної здатності (SBT та NGS) не здатне коректно інтерпретувати нестандартні випадки змін у генотипах HLA, зокрема втрату гетерозиготності. Натомість метод SSP, незважаючи на нижчу роздільну здатність, забезпечував високу чутливість до детекції залишкових клітин реципієнта, навіть за умови значного домінування донорського генотипу в зразку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Clinical Laboratory Diagnostics (2026). Immunogenetics: clinical and diagnostic aspects of the Human leukocyte antigen (HLA) system, [online] Available at: <https://clinical-laboratory-diagnostics.com/index.php?id=805>
2. Pagliuca, S., Gurnari, C., Hercus, C., Hergalant, S., Hong, S., Dhuyser, A., D'Aveni, M., Aarnink, A., Rubio, M., Feugier, P., Ferraro, F., Carraway, H., Sobecks, R., Hamilton, B., Majhail, N., Visconte, V. and Maciejewski, J. (2023). Leukemia relapse via genetic immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Nature communications*, [online] Volume 14(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38113-4> [Accessed 31 May 2023].
3. Styka, B., Reka, G., Ozygala, A., Janiszewska, M., Stelmach, M., Skowera, P., Urbańska, Z. and Lejman, M. (2025). Loss of heterozygosity in pediatric acute lymphoblastic leukemia and its prognostic impact: a retrospective study. *Cancers*, [online] Volume 17(15). Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers17152500> [Accessed 29 Jul. 2025].
4. Vago, L., Perna, S., Zanussi, M., Mazzi, B., Barlassina, C., Stanghellini, M., Perrelli, N., Cosentino, C., Torri, F., Angius, A., Forno, B., Casucci, M., Bernardi, M., Peccatori, J., Corti, C., Bondanza, A., Ferrari, M., Rossini, S., Roncarolo, M. and Fleischhauer, K. (2009). Loss of Mismatched HLA in Leukemia after Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 361(5), pp. 478–488.
5. Jaramillo, A. and Hacke, K. (2023). The human leukocyte antigen system: nomenclature and DNA-based typing for transplantation. *IntechOpen*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.1001105> [Accessed 12 Jan. 2023].
6. Choo, S. Y. (2007). The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal*, 48(1), pp. 11–23.
7. Deshpande, A. (2017). The human leukocyte antigen system. Simplified. *Global Journal of Transfusion Medicine*, 2(2), pp. 77–88.

8. Tapias, P. C., Castiblanco, J. and Anaya, J. M. (2013). Major histocompatibility complex: antigen processing and presentation. In: Anaya J. M., Shoenfeld Y., Rojas-Villarraga A., ed. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Bogota (Colombia): El Rosario University Press. Ch.10, pp. 169–185.
9. Murphy, K. and Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology*. FL: Garland Science.
10. Sabbatino, F., Liguori, L., Polcaro, G., Salvato, I., Caramori, G., Salzano, F., Casolaro, V., Stellato, C., Dal Col, J. and Pepe, S. (2020). Role of Human Leukocyte Antigen System as A Predictive Biomarker for Checkpoint-Based Immunotherapy in Cancer Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 21(19). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21197295> [Accessed 2 Oct. 2020].
11. ClinicalGate (2015). Antigen-presenting molecules, [online] Available at: <https://clinicalgate.com/antigen-presenting-molecules/>
12. Jiang, N., Yu, Y., Wu, D., Wang, S., Fang, Y., Miao, H., Ma, P., Huang, H., Zhang, M., Zhang, Y., Tang, Y. and Li, N. (2023). HLA and tumour immunology: immune escape, immunotherapy and immune-related adverse events. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(2), pp. 737–747.
13. Crux, N. B. and Elahi, S. (2017). Human Leukocyte Antigen (HLA) and Immune Regulation: How Do Classical and Non-Classical HLA Alleles Modulate Immune Response to Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections? *Frontiers in immunology*, [online] Volume 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00832> [Accessed 18 Jul. 2017].
14. Jin, P. and Wang, E. (2003). Polymorphism in clinical immunology - From HLA typing to immunogenetic profiling. *Journal of translational medicine*, [online] Volume 1(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-1-8> [Accessed 18 Nov. 2003].

15. Cardozo, D., Visentainer, J. and De Souza, C. (2024). The role of NK cell, HLA, and peptide interaction in hematopoietic stem cell transplantation. *IntechOpen*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.1007711> [Accessed 7 Oct. 2024].
16. Rodríguez, J. A. (2017). HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair immunotherapy clinical outcomes via T-cell activation. *Oncology letters*, 14(4), pp. 4415–4427.
17. Garrido, F. and Aptsiauri, N. (2019). Cancer immune escape: MHC expression in primary tumours versus metastases. *Immunology*, 158(4), pp. 255–266.
18. Dunn, G., Old, L. and Schreiber, R. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), pp. 137–148.
19. Kallingal, A., Olszewski, M., Maciejewska, N., Brankiewicz, W. and Baginski, M. (2023). Cancer immune escape: the role of antigen presentation machinery. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 149(10), pp. 8131–8141.
20. Maggs, L., Sadagopan, A., Moghaddam, A. S. and Ferrone, S. (2021). HLA class I antigen processing machinery defects in antitumor immunity and immunotherapy. *Trends in cancer*, 7(12), pp. 1089–1101.
21. Andreescu, M. and Andreescu, B. (2024). Immune Evasion Through Human Leukocyte Antigen Implications and Its Impact on Targeted Therapy. *Cureus*, [online] Volume 16(1). Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.52737> [Accessed 22 Jan. 2024].
22. Wang, D., Dou, L., Sui, L., Xue, Y. and Xu, S. (2024). Natural killer cells in cancer immunotherapy. *MedComm*, [online] Volume 5(7). Available at: <https://doi.org/10.1002/mco2.626> [Accessed 15 Jun. 2024].
23. Sauerer, T., Velázquez, G. and Schmid, C. (2023). Relapse of acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation: immune escape mechanisms and current implications for therapy. *Molecular cancer*, [online] Volume 22(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01889-6> [Accessed 15 Jun. 2024].

24. Mohamed Ahmed, A., Elagab, E., Abdalla Ahmed, E., Hassan Mahgoub, N., Dawod Faky, F., Shamina, N. and Subahi, N. (2025). Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Adult Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review. *Cureus*, [online] Volume 17(9). Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.92549> [Accessed 17 Sep. 2025].
25. Li, Z., Yang, Y., Peng, H. and Li, F. (2025). Hematopoietic stem cell microtransplantation: current situation and challenges. *Therapeutic advances in hematology*, [online] Volume 16, Available at: <https://doi.org/10.1177/20406207241310332> [Accessed 2 Jan. 2025].
26. Giralt, S. and Bishop, M. R. (2009). Principles and overview of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer treatment and research*, 144, pp. 1–21.
27. Barrett, A. J. and Battiwalla, M. (2010). Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert review of hematology*, 3(4), pp. 429–441.
28. Zeiser, R. and Vago, L. (2018). Mechanisms of immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 133(12), pp. 1290–1297.
29. Vago, L. and Gojo, I. (2020). Immune escape and immunotherapy of acute myeloid leukemia. *The Journal of clinical investigation*, 130(4), pp. 1552–1564.
30. Showel, M. and Fuchs, E. J. (2015). Recent developments in HLA-haploidentical transplantations. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 28(2–3), pp. 141–146.
31. Apperley, J., Niederwieser, D., Huang, X., Nagler, A., Fuchs, E., Szer, J. and Kodera, Y. (2016). Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Global Overview Comparing Asia, the European Union, and the United States. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 22(1), pp. 23–26.
32. Marszolek, A., Leśniak, M., Sekunda, A., Siwek, A., Skiba, Z., Lejman, M. and Zawitkowska, J. (2024). Haploidentical HSCT in the Treatment of Pediatric Hematological Disorders. *International journal of molecular sciences*, [online]

- Volume 25(12). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms25126380> [Accessed 9 Jun. 2024].
33. Champlin, R. (2003). Selection of Autologous or Allogeneic Transplantation. In: Kufe D. W., Pollock R. E., Weichselbaum R. R., ed. *Holland-Frei Cancer Medicine*. Hamilton (ON): BC Decker.
 34. Sweeney, C. and Vyas, P. (2019). The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Frontiers in oncology*, [online] Volume 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01217> [Accessed 19 Nov. 2019].
 35. Kunadt, D. and Stölzel, F. (2021). Effective Immunosurveillance After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Management and Research*, 13, pp. 7411–7427.
 36. Han, X., Zhao, J., Liu, J., Guo, D., Li, H. and Fan, S. (2022). Loss of mismatched HLA in acute myeloid leukemia relapse after haploidentical peripheral blood stem cell transplantation combined with unrelated cord blood: A case report. *Transplant immunology*, [online] Volume 73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trim.2022.101602> [Accessed 13 Apr. 2022].
 37. James, L. M. (2025). HLA-Based Immunotherapy for Cancer. *IntechOpen*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.1011836> [Accessed 2 Jul. 2025].
 38. Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*, 12(4), pp. 252–264.
 39. Nichols, C., Gibson, W., Brown, M., Kosmicki, J., Busanovich, J., Wei, H., Urbanski, L., Curimjee, N., Berger, A., Gao, G., Cherniack, A., Dhe-Paganon, S., Paoletta, B. and Beroukhi, R. (2020). Loss of heterozygosity of essential genes represents a widespread class of potential cancer vulnerabilities. *Nature communications*, [online] Volume 11(1), Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16399-y> [Accessed 20 May 2020].
 40. Ahci, M., Toffalori, C., Bouwmans, E., Crivello, P., Brambati, C., Pultrone, C., Stempelmann, K., Bost, D., Mazzi, B., Beelen, D. W., Ciceri, F., Mulder, W.,

- Fleischhauer, K. and Vago, L. (2017). A new tool for rapid and reliable diagnosis of HLA loss relapses after HSCT. *Blood*, 130(10), pp. 1270–1273.
41. Arnold, P. Y. (2022). Review: HLA loss and detection in the setting of relapse from HLA-mismatched hematopoietic cell transplant. *Human immunology*, 83(10), pp. 712–720.
42. Huggins, R., Li, L., Lin, Y., Yu, A. L. and Yang, H. (2008). Nonparametric estimation of LOH using Affymetrix SNP genotyping arrays for unpaired samples. *Journal of Human Genetics*, 53(11–12), pp. 983–990.
43. Lee, M. P. (2012). Allele-specific gene expression and epigenetic modifications and their application to understanding inheritance and cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1819(7), pp. 739–742.
44. Dutta, A. and Schacherer, J. (2025). The dynamics of loss of heterozygosity events in genomes. *EMBO Reports*, 26(3), pp. 602–612.
45. Erola, P., Torabi, K., Miró, R. and Camps, J. (2019). The non-random landscape of somatically-acquired uniparental disomy in cancer. *Oncotarget*, 10(40), pp. 3982–3984.
46. O'Keefe, C., McDevitt, M. A. and Maciejewski, J. P. (2010). Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*, 115(14), pp. 2731–2739.
47. Garrido, M., Perea, F., Vilchez, J., Rodríguez, T., Anderson, P., Garrido, F., Ruiz-Cabello, F. and Aptsiauri, N. (2021). Copy Neutral LOH Affecting the Entire Chromosome 6 Is a Frequent Mechanism of HLA Class I Alterations in Cancer. *Cancers*, [online] Volume 13(20). Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13205046> [Accessed 9 Oct. 2021].
48. Федоренко, З. П., Сумкіна, О. В., Горох, Є. Л., Гулак, Л. О. та Кропельницький, М. С. (2025). Рак в Україні, 2023-2024: Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби: Бюлетень Національного канцер-реєстру України № 26. Національний інститут раку. 2025. 129 с.

49. Siveen, K. S., Uddin, S. and Mohammad, R. M. (2017). Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products. *Molecular cancer*, [online] Volume 16(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0571-x> [Accessed 30 Jan. 2017].
50. OncoHemaKey (2016). Hematopoietic Stem Cells: The Basis of Normal and Malignant Hematopoiesis, [online] Available at: <https://oncohemakey.com/hematopoietic-stem-cells-the-basis-of-normal-and-malignant-hematopoiesis/>
51. Calabretta, B. and Perrotti, D. (2004). The biology of CML blast crisis. *Blood*, 103(11), pp. 4010–4022.
52. Welch, J., Ley, T., Link, D., Miller, C., Larson, D., Koboldt, D., Wartman, L., Lamprecht, T., Liu, F., Xia, J., Kandoth, C., Fulton, R., McLellan, M., Dooling, D., Wallis, J., Chen, K., Harris, C., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., Lu, C. and Wilson, R. (2012). The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, 150(2), pp. 264–278.
53. Makkar, H., Majhi, R., Goel, H., Gupta, A., Chopra, A., Tanwar, P. and Seth, R. (2023). Acute myeloid leukemia: novel mutations and their clinical implications. *American journal of blood research*, 13(1), pp. 12–27.
54. Tuval, A. and Shlush, L. I. (2019). Evolutionary trajectory of leukemic clones and its clinical implications. *Haematologica*, 104(5), pp. 872–880.
55. Pandolfi, A., Barreyro, L. and Steidl, U. (2013). Concise review: preleukemic stem cells: molecular biology and clinical implications of the precursors to leukemia stem cells. *Stem cells translational medicine*, 2(2), pp. 143–150.
56. Apostolidou, E., Georgoulis, V., Leonardos, D., Benetatos, L., Kapsali, E. and Hatzimichael, E. (2026). Decoding Leukemic Stem Cells in AML: From Identification to Targeted Eradication. *Diseases*, [online] Volume 14(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/diseases14020050> [Accessed 30 Jan. 2026].
57. Smith, S. C. and Zhang, L. (2025). Germline and Somatic Changes Associated with the Development of Inherited and De Novo Pediatric Acute Myeloid

- Leukemia. *Genes*, [online] Volume 16(7). Available at: <https://doi.org/10.3390/genes16070798> [Accessed 1 Jul. 2025].
58. Klco, J. M. and Mullighan, C. G. (2021). Advances in germline predisposition to acute leukaemias and myeloid neoplasms. *Nature reviews. Cancer*, 21(2), pp. 122–137.
59. Martignoles, J., Delhommeau, F. and Hirsch, P. (2018). Genetic Hierarchy of Acute Myeloid Leukemia: From Clonal Hematopoiesis to Molecular Residual Disease. *International journal of molecular sciences*, [online] Volume 19(12). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms19123850> [Accessed 3 Dec. 2018].
60. Vago, L. (2019). Clonal evolution and immune evasion in posttransplantation relapses. *Hematology. American Society of Hematology Education Program*, 2019(1), pp. 610–616.
61. Olesinski, E. A. and Bhatt, S. (2025). Pandora’s Box of AML: How TP53 Mutations Defy Therapy and Hint at New Hope. *Biomedicines*, [online] Volume 13(12). Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines13123007> [Accessed 8 Dec. 2025].
62. Worker, A., Jinks, N., Woodmancy, P., Seedhouse, C. and Kellaway, S. G. (2025). How to drug a leukemic stem cell: deciphering heterogeneity for better specificity. *Blood Neoplasia*, [online] Volume 2(4). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bneo.2025.100146> [Accessed 10 Sep. 2025].
63. Deol, A. and Lum, L. G. (2010). Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer treatment reviews*, 36(7), pp. 528–538.
64. Rovatti, P., Gambacorta, V., Lorentino, F., Ciceri, F. and Vago, L. (2020). Mechanisms of Leukemia Immune Evasion and Their Role in Relapse After Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Frontiers in immunology*, [online] Volume 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00147> [Accessed 25 Feb. 2020].
65. Miller, J., Warren, E., Van Den Brink, M., Ritz, J., Shlomchik, W., Murphy, W., Barrett, A., Kolb, H., Giralt, S., Bishop, M., Blazar, B. and Falkenburg, J. (2010).

- NCI First International Workshop on The Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Report from the Committee on the Biology Underlying Recurrence of Malignant Disease following Allogeneic HSCT: Graft-versus-Tumor/Leukemia Reaction. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 16(5), pp. 565–586.
66. Jan, M. and Majeti, R. (2013). Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene*, 32(2), pp. 135–140.
67. Knorr, D. A., Goldberg, A. D., Stein, E. M. and Tallman, M. S. (2019). Immunotherapy for acute myeloid leukemia: from allogeneic stem cell transplant to novel therapeutics. *Leukemia & lymphoma*, 60(14), pp. 3350–3362.
68. Dinauer, D., Schiller, J., Nytes, J., Berchanskiy, D., Glumm, R., Gaba, S., Janasik, M., Hudson, C. A., Brodersen, L. E., Fritschle, W. and Anderson, M. W. (2022). A novel Multi-Analytic Clinical Diagnostic assay to detect HLA loss of heterozygosity in Post-Hematopoietic cell transplant relapse patients. *Blood*, 140(1), pp. 4964–4965.
69. One Lambda. (2018). AllSet+™ Gold SSP Typing Kits: Instructions for Use. [online] Available at: <https://www.veritastk.co.jp/products/pdf/E-OLIMSSP.pdf>
70. Geo, J. A., Ameen, R., Al Shemmari, S. and Thomas, J. (2024). Advancements in HLA Typing Techniques and Their Impact on Transplantation Medicine. *Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University*, 33(3), pp. 215–231.
71. Choi, H., Choi, E., Kim, H., Baek, I., Won, A., Park, S., Kim, T. and Chung, Y. (2024). A walk through the development of human leukocyte antigen typing: from serologic techniques to next-generation sequencing. *Clinical transplantation and research*, 38(4), pp. 294–308.
72. Heather, J. M. and Chain, B. (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), pp. 1–8.

73. Caragea, A., Bohiltea, L., Constantinescu, A., Constantinescu, I. and Ursu, R. (2025). NGS and Immunogenetics: Sequencing the HLA Genes. *IntechOpen*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.1008527> [Accessed 2 Dec. 2024].
74. Sanchez-Mazas, A. and Nunes, J. M. PGAE HLA Consortium of the 18th International HLA and Immunogenetics Workshop (2024). The most frequent HLA alleles around the world: A fundamental synopsis. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, [online] Volume 37(2). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.beha.2024.101559> [Accessed 8 Jul. 2024].
75. One Lambda (2011). Micro SSP™ HLA Typing Tray, [online] Available at: <https://www.veritastk.co.jp/products/pdf/E-OLI-MSSP.pdf>
76. Lee, M. Y. and You, E. (2024). The Importance of Confirming False Homozygosity in Pretransplant HLA Typing Results of Patients with Hematologic Malignancies. *International journal of medical sciences*, 21(13), pp. 2430–2436.
77. Zhou, Y. (2025). From sanger to Single Molecule: A Comparative review of DNA sequencing technologies and their applications. *Theoretical and Natural Science*, 99(1), pp. 102–108.
78. Cao, X., Wang, J., Zhao, Y., Xiong, M., Lu, Y., Sun, R., Zhang, J., Liu, D., Zhou, J., Wei, Z. and Lu, P. (2025). The impact of HLA loss of heterozygosity on outcome after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in hematological malignancies. *Blood*, 146(1), p. 2498.
79. Heyrman, B., De Becker, A., Verheyden, S. and Demanet, C. (2017). False homozygous HLA genotyping results due to copy number neutral loss of heterozygosity in acquired aplastic anaemia. *BMJ case reports*, [online] Volume 2017. Available at: <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-217867> [Accessed 2 Mar. 2017].
80. Döhner, H., Wei, A., Appelbaum, F., Craddock, C., DiNardo, C., Dombret, H., Ebert, B., Fenaux, P., Godley, L., Hasserjian, R., Larson, R., Levine, R., Miyazaki, Y., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G., Röllig, C., Sierra, J., Stein,

- E., Tallman, M. S. and Löwenberg, B. (2022). Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, 140(12), pp. 1345–1377.
81. Tsiatis, A., Norris-Kirby, A., Rich, R., Hafez, M., Gocke, C., Eshleman, J. and Murphy, K. (2010). Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 12(4), pp. 425–432.
82. Fortschegger, M., Preuner, S., Printz, D., Poetsch, A., Geyeregger, R., Pichler, H., Lawitschka, A. and Lion, T. (2020). Detection and Monitoring of Lineage-Specific Chimerism by Digital Droplet PCR-Based Testing of Deletion/Insertion Polymorphisms. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 26(6), pp. 1218–1224.
83. Sishchuk, L. O., Tubaltseva, I. I., Tsokolenko, N. A., Maksymchuk, A. O., Kukhol, A. V., Andrusenko, V. V., Mazanova, A. O. and Hrohul, Y. A. (2025). Limitations of human leukocyte antigen molecular typing methods for patients with acute myeloid leukemia relapse after hematopoietic stem cell transplantation. *Biotechnologia Acta*, 18(2), pp. 89–91.
84. Mohd Nippah, N., Abu, N., Ab Mutalib, N. and Alias, H. (2024). Advances in next-generation sequencing for relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia: current insights and future directions. *Frontiers in genetics*, [online] Volume 15. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2024.1394523> [Accessed 4 Jun. 2024].