

Возможность использования донор-специфической бесклеточной ДНК как биомаркера для оценки функции почечного трансплантата

Субботина Т.Н.^{1,2}, Курочкин Д.В.¹, Шевченко А.И.¹, Хлобыстин Р.Ю.^{2,3},
Якименко О.Н.², Наговицына Р.Ю.², Оскорбин И.П.⁴, Воронина Е.Н.⁴,
Филипенко М.Л.⁴

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет», 660041, г. Красноярск, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства», 660037, г. Красноярск, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого», 660022, г. Красноярск, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», 630090, г. Новосибирск, Российская Федерация

Резюме

Актуальность. В настоящее время для мониторинга состояния аллотрансплантата при трансплантации почки используются неспецифические клинико-лабораторные показатели, имеющие низкую прогностическую ценность для выявления продолжающегося активного отторжения. Один из новейших способов раннего обнаружения повреждения заключается в измерении количества бесклеточной ДНК (cfDNA) в плазме или моче реципиента и способности дифференцировать cfDNA донора и реципиента.

Цель – оценить возможность использования донор-специфической бесклеточной ДНК как биомаркера для оценки функции почечного трансплантата.

Материал и методы. В работу включены 9 реципиентов, которым в 2021–2022 гг. в ФГБУ ФСНКЦ ФМБА России (г. Красноярск) была проведена трансплантации почки от 6 доноров. Для количественного обнаружения бесклеточной ДНК (cfDNA) и бесклеточной ДНК донора (dd-cfDNA) использовали метод цифровой полимеразной цепной реакции. Концентрацию сывороточного креатинина и С-реактивного белка определяли на автоматическом биохимическом анализаторе.

Результаты. При динамическом наблюдении во время раннего послеоперационного периода у всех реципиентов происходит последовательное снижение уровня анализируемых показателей (dd-cfDNA, cfDNA, креатинина и С-реактивного белка). Один из реципиентов в позднем послеоперационном периоде имел тяжелую дисфункцию нефротрансплантата, на фоне чего наблюдалось повышение уровня бесклеточной ДНК реципиента. В дальнейшем на фоне проводимого лечения и восстановления функции трансплантата отмечалось снижение уровня креатинина и бесклеточной ДНК реципиента.

Заключение. Проведенное исследование показывает, что применение метода исследования бесклеточной ДНК и поиск фракций донора в крови реципиента является возможным и сопоставимым с результатами биохимических маркеров.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Субботина Т.Н., Курочкин Д.В., Шевченко А.И., Хлобыстин Р.Ю., Якименко О.Н., Наговицына Р.Ю., Оскорбин И.П., Воронина Е.Н., Филипенко М.Л. Возможность использования донор-специфической бесклеточной ДНК как биомаркера для оценки функции почечного трансплантата // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского. 2024. Т. 12, № 2. С. 13–20. DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-1198-2024-12-2-13-20>

Статья поступила в редакцию 20.12.2023. Принята в печать 07.05.2024.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ

Субботина Татьяна Николаевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской биологии; заведующий научно-практической лабораторией молекулярно-генетических методов исследований ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; научный сотрудник ФГБУ ФСНКЦ ФМБА России (Красноярск, Российская Федерация)
E-mail: stn.25@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>

Ключевые слова:

трансплантация почки;
cf-DNA, dd-cfDNA;
острое отторжение;
сывороточный
креатинин;
С-реактивный белок

Possibility of using donor-specific cell-free DNA as biomarker for assessment of renal graft function

CORRESPONDENCE

Tatiana N. Subbotina – MD, Associate Professor, Department of Medical Biology; Head of the Scientific and Practical Laboratory of Molecular Genetic Research Methods, Siberian Federal University; Researcher at the Federal Scientific and Research Center, Federal Medical and Biological Agency of Russia (Krasnoyarsk, Russian Federation)
E-mail: stn.25@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>

Keywords:

transplantation of the kind; cf-DNA, dd-cfDNA; acute rejection; serum creatinin; C-reactive protein

Subbotina T.N.^{1,2}, Kurochkin D.V.¹, Shevchenko A.I.¹, Khlobystin R.Yu.^{2,3}, Yakimenko O.N.², Nagovitsyna R.Yu.², Oskorbin I.P.⁴, Voronina E.N.⁴, Filipenko M.L.⁴

¹ Siberian Federal University, 660041, Krasnoyarsk, Russian Federation

² Federal Siberian Scientific and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency, 660037, Krasnoyarsk, Russian Federation

³ Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation, 660022, Krasnoyarsk, Russian Federation

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract

Background. At present, non-specific clinical and laboratory parameters are used to monitor allograft status in kidney transplantation, which have low prognostic value for detection of the ongoing active rejection. One of the newest ways of early damage detection is to measure the amount of cell-free DNA in the recipient's plasma or urine and the ability to differentiate between the cfDNA donor and recipient.

Aim – is to evaluate to evaluate the possibility of using donor-specific cell-free DNA as a biomarker to assess renal graft function.

Material and methods. We included 9 recipients who underwent kidney transplantation from 6 donors in 2021–2022 in the Federal Siberian Research Clinical Centre under the FMBA of Russia (Krasnoyarsk city). Digital PCR was used for quantitative detection of cell-free DNA (cfDNA) and donor cell-free DNA (dd-cfDNA). Serum creatinine and C-reactive protein concentrations were determined on an automatic biochemical analyser.

Results. In the process of dynamic follow-up during the early postoperative period, all recipients have a consistent decrease in the levels of the analysed parameters (dd-cfDNA, cfDNA, creatinine and C-reactive protein). One of the recipients in the late postoperative period had severe nephro-transplant dysfunction, associated with which an increase in the level of cell-free DNA of the recipient was observed. Further following the conducted treatment and restoration of the graft function the decrease in the level of creatinine and cell-free DNA of the recipient was observed.

Conclusion. The conducted study shows that the application of cell-free DNA testing and searching for donor fractions in the recipient's blood is feasible and comparable to the results of biochemical markers.

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For citation: Subbotina T.N., Kurochkin D.V., Shevchenko A.I., Khlobystin R.Yu., Yakimenko O.N., Nagovitsyna R.Yu., Oskorbin I.P., Voronina E.N., Filipenko M.L. Possibility of using donor-specific cell-free DNA as biomarker for assessment of renal graft function. Clinical and Experimental Surgery. Petrovsky Journal. 2024; 12 (2): 13–20. DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-1198-2024-12-2-13-20> (in Russian)

Received 20.12.2023. **Accepted** 07.05.2024.

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

«Золотым стандартом» мониторинга состояния трансплантатов солидных органов традиционно является биопсия. Она может быть выполнена при подозрении на патологию трансплантата по данным лабораторного контроля или клинических проявле-

ний либо в рамках обычного протокола мониторинга. Однако биопсия представляет собой инвазивную процедуру, которая неудобна для пациентов, несет в себе определенные риски [1], к тому же около 25% образцов непригодны к использованию [2, 3]. Помимо этого, для всех процедур биопсии требуется госпитализация. Это, в свою очередь, делает данную процедуру дорогостоящей.

Наряду с исследованием биоптата для мониторинга повреждения аллотрансплантата при трансплантации почки используются такие клинико-лабораторные показатели, как уровень сывороточного креатинина, наличие протеинурии, уровень донор-

специфических антител, скорость клубочковой фильтрации (СКФ) [4, 5]. Хотя уровень сывороточного креатинина и СКФ остаются основой для оценки функции почечного аллотрансплантата, мониторинг динамики данных показателей имеет низкую прогностическую ценность для выявления продолжающегося активного отторжения. Так, изменение уровня креатинина в сыворотке крови не является специфичным для повреждения трансплантата, а может указывать на внутренний почечный процесс, такой как острое отторжение или инфекция трансплантата [6]. Кроме того, клинические признаки повреждения трансплантата появляются на поздних стадиях, после стадии субклинического повреждения [7]. Биопсия может привести к осложнениям у реципиента [1].

Именно недостатки мониторинга состояния пересаженных органов привели к большому интересу к неинвазивным стратегиям выявления повреждения или отторжения трансплантата. Один из предложенных способов обнаружения повреждения трансплантата заключается в измерении количества бесклеточной ДНК донора (dd-cfDNA) в плазме или моче реципиента [8–10].

По мере разрушения клеток донорского трансплантата нуклеиновые кислоты становятся фрагментированными, в результате чего dd-cfDNA размером примерно 120–160 пар оснований высвобождаются в кровь и выводятся из крови печенью и почками с периодом полураспада около 30 мин. Считается, что высвобождение бесклеточной ДНК в кровоток является результатом нескольких возможных механизмов, включая гибель клеток в результате апоптоза или некроза, в дополнение к активной секреции различными активированными клетками иммунной системы [11, 12].

Когда нет активного повреждения аллотрансплантата, dd-cfDNA в плазме реципиента обычно имеет низкую концентрацию – всего несколько тысяч геномных копий на 1 мл [13], что составляет менее 1% всей внеклеточной ДНК [10]. Однако во время отторжения аллотрансплантата значительно больше dd-cfDNA высвобождается из поврежденного органа в кровоток [10, 13]. Проводимые в настоящее время исследования, направленные на измерение уровня dd-cfDNA в динамике послеоперационного периода при пересадке почечного трансплантата и сравнение данных показателей с соответствующими значениями концентрации креатинина, подтверждают предпосылку возможности количественного измерения уровня dd-cfDNA и интерпретации данных как инструмента для оценки относительного состояния аллотрансплантата и диагностики возможных осложнений [14, 15].

Цель – оценить возможность использования донор-специфической бесклеточной ДНК как биомаркера для оценки функции почечного трансплантата.

Материал и методы

В работу включены 9 реципиентов, которым в 2021–2022 гг. в Федеральном Сибирском научно-клиническом центре ФМБА России (г. Красноярск) была проведена трансплантация почки от 6 доноров. Все пациенты дали письменное добровольное информированное согласие на проведение исследования. Согласно руководству по диагностическому лабораторному обеспечению трансплантации солидных органов, предварительно всем донорам и реципиентам проводилось HLA-типирование по трем локусам HLA-A, HLA-B и HLA-DR методом ПЦР-SSP на наборах низкого разрешения OLERUP SSP HLA TYPING KIT с Taq-полимеразой (Olerup, Sweden). Детекция результатов осуществлялась методом электрофореза в 2% агарозном геле. Результаты интерпретировались с помощью программного обеспечения для SSP HLA-типирования SCORE (Olerup, Sweden).

Всего были сформированы 9 пар донор–реципиент, из них 5 пар, где донор – мужчина, а реципиент – женщина; 1 пара – донор – женщина и реципиент – женщина; 3 пары – донор – мужчина и реципиент – мужчина. Следует отметить, что реципиенты из всех исследуемых пар имели стабильный ранний послеоперационный период. В то же время реципиент из пары № 9 в позднем послеоперационном периоде имел тяжелую дисфункцию нефротрансплантата, связанную с инфарктом нижнего полюса донорской почки и развитием вследствие этого гнойно-септических осложнений.

В ходе выполнения поставленной цели были использованы два подхода. Первый применим только для случаев, в которых донор – мужчина, а реципиент – женщина и предполагается использование специфической последовательности гена *SRY* для количественной оценки мужской dd-cfDNA в плазме женщины. Одновременно с этим также анализируется участок гена домашнего хозяйства *RPP30* для оценки общей cfDNA. При реализации данного подхода были обследованы реципиенты из 5 пар (№ 1–5), где донор – мужчина, а реципиент – женщина. Второй подход применим для всех случаев донор – реципиент, предполагает предварительное проведение генотипирования реципиента и соответствующего донора с целью поиска таких SNP, по которым они имеют различные аллельные варианты в гомозиготном состоянии. Выбранные аллельные варианты далее используются для их количественной оценки в составе cfDNA реципиента. При реализации данного подхода были обследованы доноры и реципиенты из четырех пар (№ 6–9). При этом одна пара, в которой донор – женщина и реципиент – женщина, и три пары, в которых донор – мужчина и реципиент – мужчина.

В соответствии с этим объектом исследования при проведении работы являлась cfDNA от

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов, использованных при анализе генов *SRY* и *RPP30* методом ddPCR при реализации первого подхода

Ген	Последовательность 5'-3'
<i>SRY</i>	F CGCTTAACATAGCAGAAGCA
	R AGTTTCGAAGCTGGCACCT
	Probe FAM-TGTCGCACTCTCTGTTTGTGACA-BHQ1
<i>RPP30</i>	F GATTGGACCTGCGAGCG
	R GCGGCTGTCTCCACAAGT
	Probe HEX-TCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ2

всех реципиентов, а также геномная ДНК от доноров и реципиентов, включенных в исследование при выполнении второго подхода. Геномную ДНК доноров и реципиентов выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием набора реагентов ДНК-Сорб-В («АмплиСенс», Россия). cfDNA выделяли из 2 мл плазмы крови реципиентов с помощью набора QIAmp MinElute cfDNA (Qiagen, Valencia) или из 1 мл с помощью набора HiPure Circulating Nucleic acid Mini Kit (Magen Biotechnology, China). Для отбора крови реципиентов при этом использовали вакутейнеры VACUETTE 8мл K2 с EDTA и разделительным гелем (Greiner Bio-One, Austria). Для отделения плазмы от форменных элементов в течение 2 ч после взятия крови у реципиента выполняли двухэтапное центрифугирование при 2500g. Забор крови у реципиентов осуществлялся по следующей схеме: 3 раза в неделю первые 2 нед после операции, в дальнейшем один раз в неделю до выписки пациента из больницы.

Для количественного обнаружения dd-cfDNA и cfDNA при реализации как первого, так и второго подхода использовали метод цифровой полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ddPCR).

В соответствии с первым подходом при использовании специфической последовательности гена *SRY* для количественной оценки мужской dd-cfDNA в плазме женщины-реципиента проводили ddPCR, в ходе которой одновременно анализировали участок гена *RPP30* для оценки общей cfDNA. При этом важно было подобрать такие праймеры, которые бы фланкировали небольшие участки последовательности генов (*SRY* и *RPP30*), поскольку длина cfDNA, по данным литературы, не превышает 150–200 пар нуклеотидов [10]. Праймеры и зонд для анализа гена *SRY* были заимствованы из статьи [16], праймеры и зонд для анализа гена *RPP30* были подобраны сотрудниками лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН г. Новосибирск. Последовательности используемых в данном случае праймеров и зондов представлены в табл. 1.

Реакционная смесь для проведения цифровой ПЦР объемом 20 мкл включала 10 мкл 2-кратного ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad, USA), по 1 мкл 20-кратной смеси праймеры/

зонд (финальная концентрация 900 нМ/250 нМ) и 8 мкл cf-DNA. Цифровую ПЦР проводили с помощью системы QX100 (Bio-Rad, USA) с предварительной ручной генерацией капель. Предварительную амплификацию проводили на термоциклере C1000 (Bio-Rad, USA) по следующей программе: денатурация при 95 °C в течение 3 мин; амплификация: 94 °C в течение 30 с и 58 °C в течение 1 мин (40 циклов); деактивация фермента при 98 °C в течение 10 мин и охлаждение при 4 °C в течение 15 мин. Результаты анализировали в программе QuantaSoft Analysis Pro (Bio-Rad, USA).

В соответствии со вторым подходом для проведения генотипирования 4 реципиентов и соответствующих доноров с целью поиска таких SNP, по которым они имеют различные аллельные варианты в гомозиготном состоянии, были апробированы 30 вариантов SNPs.

Для подбора панели SNPs необходимо было найти полиморфизмы с высокой частотой минорных аллелей (MAF) 0,4–0,5. Основываясь на расчетах равновесия Харди–Вайнберга, SNP с MAF от 0,4 до 0,5 имеет почти равное распределение обоих аллелей в данной популяции и, следовательно, вероятность 11,5–12,5% наличия другого (гомозиготного) генотипа у двух особей этой популяции (например, донора и реципиента). Следовательно, набора из 30–35 SNPs достаточно, чтобы идентифицировать по меньшей мере 3 информативных однонуклеотидных полиморфизма для каждой пары донор–реципиент, которые можно использовать в дальнейшем анализе [17].

Генотипирование проводили методом TaqMan-ПЦР с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ («Синтол», Россия) в присутствии флуоресцирующих зондов. Реакционная смесь объемом 25 мкл включала 12,75 мкл H₂O, 2,5 мкл dNTPs, 2,5 мкл 10x ПЦР буфер Б, 2,5 мкл MgCl₂, 2,5 мкл смеси праймеров и зондов, 0,25 мкл ДНК-полимеразы и 2 мкл образца ДНК. Амплификацию проводили на термоциклере CFX96 (Bio-Rad, USA) по следующей программе: 95 °C в течение 3 мин и далее 40 циклов: 95 °C в течение 10 с и 58 °C в течение 35 с.

По результатам проведения генотипирования для 3 включенных в данное исследование пар (№ 6, 7 и 8) удалось подобрать по 2 SNP, а для пары № 9 только 1 SNP, по которым донор и реципиент имели бы различные аллельные варианты в гомозиготном состоянии. Как упоминалось выше, именно реципиент из пары № 9 имел посттрансплантационные осложнения в позднем послеоперационном периоде. Последовательности отобранных праймеров и зондов представлены в табл. 2. Те последовательности, которые далее также были использованы и для проведения ddPCR, выделены жирным шрифтом.

Далее для количественной оценки dd-cfDNA и cfDNA реципиента методом ddPCR проводили

Тапман-ПЦР с использованием праймеров и зондов к подобранным альтернативным гомозиготным аллельным SNP вариантам донора и реципиента. Состав реакционной смеси, программа амплификации и анализ полученных данных при проведении ddPCR соответствовали тем, которые были использованы при реализации первого подхода.

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

Результаты

Как упоминалось выше, в работе были использованы два подхода. Первый применим только для случаев, в которых донор – мужчина, а реципиент – женщина, и предполагает использование специфической последовательности гена *SRY* для количественной оценки мужской dd-cfDNA в плазме женщины. Одновременно с этим также анализируется участок гена домашнего хозяйства для оценки общей cfDNA реципиента. Второй подход применим для всех случаев донор–реципиент и предполагает предварительное проведение генотипирования реципиента и соответствующего донора с целью поиска таких SNPs, по которым они имеют различные аллельные варианты в гомозиготном состоянии. Выбранные аллельные варианты далее используются для их количественной оценки в составе cfDNA реципиента.

В соответствии с первым подходом были проанализированы 5 реципиентов из пар, в которых донор – мужчина, а реципиент – женщина. При

Таблица 2. Список генов, rs, а также последовательности праймеров и зондов, использованных как для генотипирования, так и для проведения ddPCR при реализации второго подхода

№ пары	Ген, rs	Праймер/зонд	Последовательность 5'-3'
6	FUT2, G>A rs602662	F	GACCAGCGATACCTACAGCAG
		R	GCAGGTGAGCCCTCAATG
		probe-1	FAM-CCACATCACTGTGGGAGGTG-BHQ
		probe-2	R6G-CCACATCACCGTGGGAGG-BHQ
	TERT, C>A rs2736100	F	CTATCTGAGGCATCTTGACAC
		R	AGAAGACAGACGGGAACA
		probe-1	FAM-AGTGTTCCTTAGCTTTGCC-BHQ
		probe-2	R6G-AGTGTTCCTTAGCTTTGCC-BHQ
7	P53, G>A, C, T rs1042522	F	GCTCCCAGATGCCAGAG
		R	GGGAAGGGACAGAAGATGAC
		probe-1	FAM-CTCCCCGCGTGGCCC-BHQ
		probe-2	R6G-CTCCCCGCGTGGCCC-BHQ
	IL6, G>A, C rs1800796	F	CGAGACGCCCTGAAGTAAGT
		R	CATCTGAGTCTTGTGTGTCTG
		probe-1	FAM-CAACAGCCGCTCACAGG-BHQ
		probe-2	R6G-CAACAGCCGCTCACAGG-BHQ
8	PROC, A>G, T rs1799810	F	TGCTACTGCCACTGTTGTCT
		R	CCACACCCCTCATAGACCTG
		probe-1	FAM-CTGCAAGTTCGCCGTCC-BHQ
		probe-2	R6G-CTGCAAGTACGCCGTCT-BHQ
	PROC, G>A, C rs2069915	F	CCCAGACAGACACTTCACAGAG
		R	CGTGAGCCCCATCTTGAC
		probe-1	FAM-CAGTCTCTCTTCTCTCCCC-BHQ
		probe-2	R6G-CAGTCTCTCTCTCTCCCC-BHQ
9	OGG1, C>G, rs1052133	F	ACACAGACTCCACCTCTACAC
		R	GCCTTTGAGGTAGTCACAGGGAG
		probe-1	FAM-CGCCAATGCCGCCATG-BHQ
		probe-2	R6G-CGCCAATGCCGCCATG-BHQ

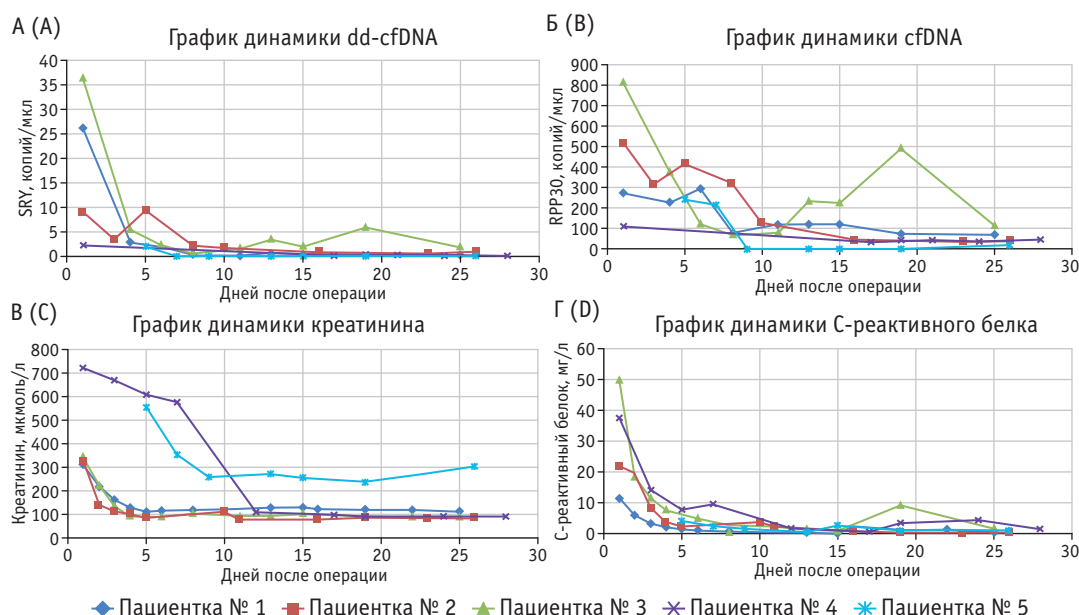
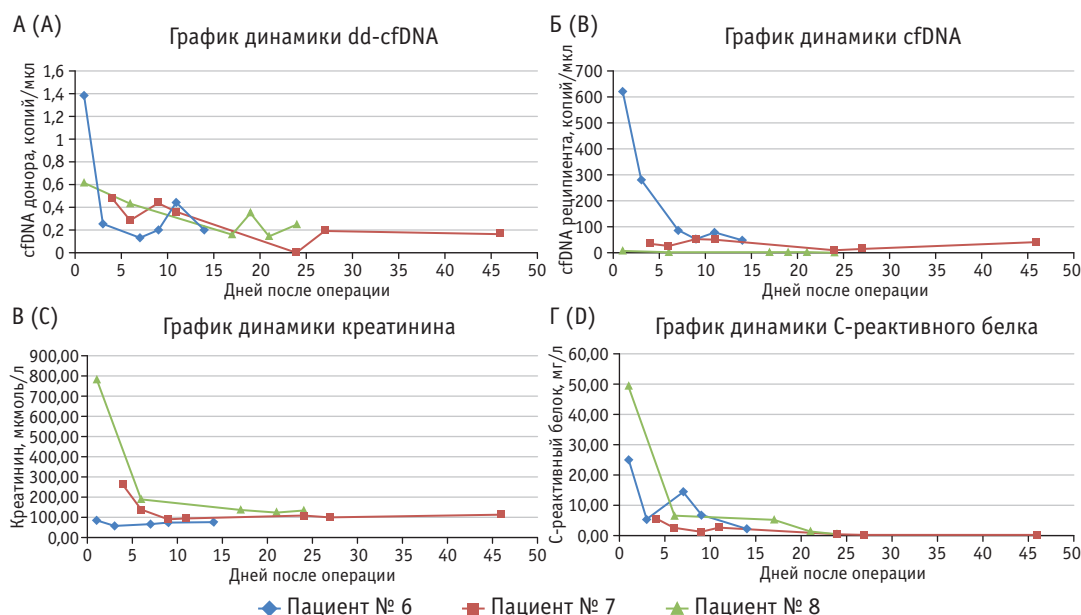


Рис. 1. Графики изменения концентрации dd-cfDNA (A), общей cfDNA (B), креатинина (C) и С-реактивного белка (D) у 5 пациенток в динамике раннего послеоперационного периода

Fig. 1. Graphs of changes in dd-cfDNA (A), total cfDNA (B), creatinine (C) and C-reactive protein (D) concentrations in female patients in the dynamics of the early postoperative period

Рис. 2. Графики изменения концентрации dd-cfDNA (А), cfDNA реципиента (Б), креатинина (В) и С-реактивного белка (Г) у 3 пациентов в динамике раннего послеоперационного периода

Fig. 2. Graphs of changes in dd-cfDNA (A), recipient cfDNA (B), creatinine (C) and C-reactive protein (D) in three patients in the dynamics of the early postoperative period



этом для количественной оценки мужской dd-cfDNA в плазме женщины-реципиента использовали праймеры и зонды к специфической последовательности гена *SRY*, а для оценки общей cfDNA – к участку гена *RPP30*. На рис. 1 представлены графики изменения концентрации донорской и общей cfDNA, а также креатинина и СРБ для всех 5 пациенток в динамике раннего послеоперационного периода.

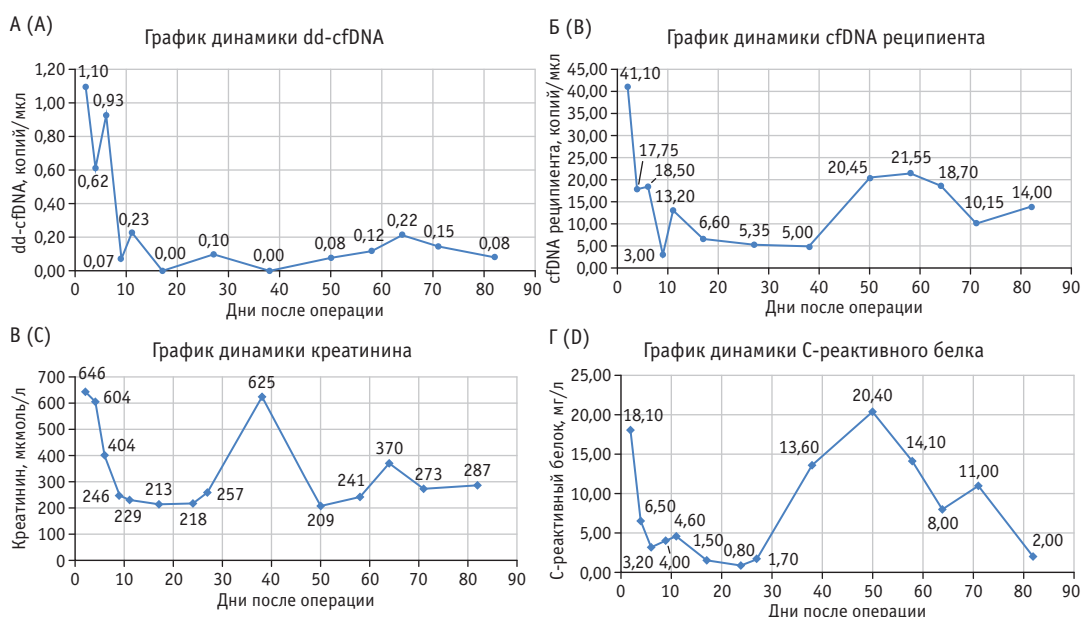
В соответствии со вторым подходом были проанализированы 4 пары: одна пара, в которой донор – женщина и реципиент – женщина; 3 пары, в которых донор – мужчина и реципиент – мужчина. При этом для количественной оценки dd-cfDNA и собственной cfDNA реципиента использовали праймеры и зонды к предварительно отобраным

альтернативным аллельным SNP вариантам донора и реципиента. Так, при анализе пары № 6 аллель А полиморфизма rs602662 использовали для оценки dd-cfDNA, а аллель Г для оценки cfDNA реципиента. При анализе пары № 7 аллель С полиморфизма rs1042522 использовали для оценки dd-cfDNA, а аллель Г для оценки cfDNA реципиента. При анализе пары № 8 аллель Т полиморфизма rs1799810 использовали для оценки dd-cfDNA, а аллель А для оценки cfDNA реципиента. При анализе пары № 9 аллель Г полиморфизма rs1052133 использовали для оценки dd-cfDNA, а аллель С для оценки cfDNA реципиента.

Как упоминалось ранее, реципиенты из всех исследуемых пар имели стабильный ранний после-

Рис. 3. Графики изменения концентрации dd-cfDNA (А), cfDNA реципиента (Б), креатинина (В) и С-реактивного белка (Г) у пациента № 9 в динамике длительного послеоперационного периода

Fig. 3. Graphs of changes in dd-cfDNA (A), recipient cfDNA (B), creatinine (C) and C-reactive protein (D) in patient # 9 in the dynamics of the long-term postoperative period



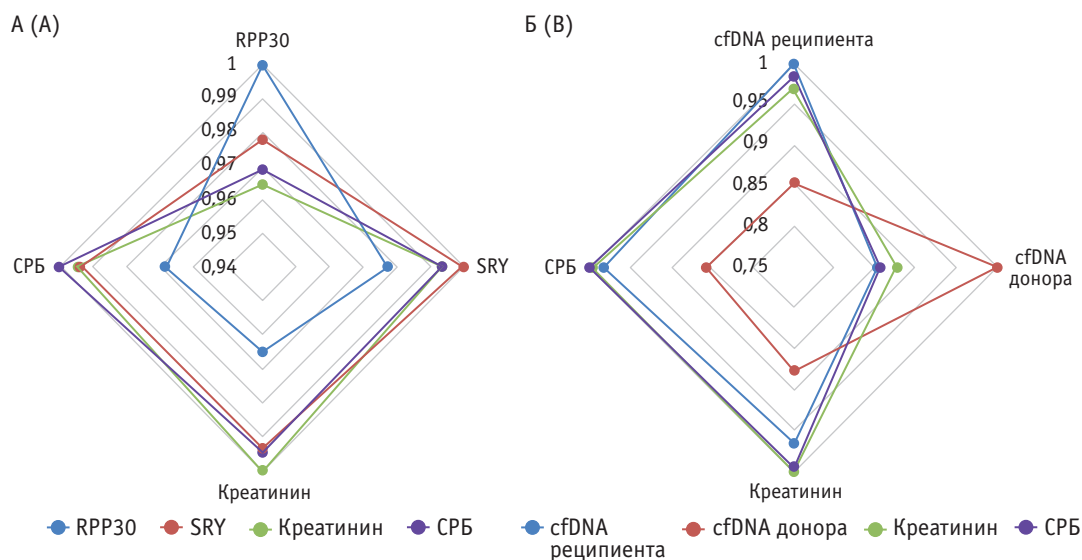


Рис. 4. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена для ненормального распределения по 4 исследуемым параметрам (dd-cfDNA, cfDNA, креатинин, С-реактивный белок): А – распределение параметров при использовании первого подхода, Б – распределение параметров при использовании второго подхода

Fig. 4. Spearman's rank correlation coefficients for non-normal distribution for the four parameters under study (dd-cfDNA, cfDNA, creatinine, C-reactive protein): А – parameter distribution using the first approach, Б – parameter distribution using the second approach

операционный период. Так, на рис. 2 представлены графики изменения концентрации dd-cfDNA и собственной cfDNA реципиента, а также креатинина и СРБ для пациентов №6, 7 и 8 в динамике раннего послеоперационного периода.

В то же время реципиент из пары № 9 в позднем послеоперационном периоде имел тяжелую дисфункцию нефротрансплантата, связанную с инфарктом нижнего полюса донорской почки и развитием вследствие этого гнойно-септических осложнений. В связи с этим полученные для пациента № 9 результаты приведены на рис. 3, в частности представлены графики изменения концентрации dd-cfDNA, собственной cfDNA реципиента, а также креатинина и СРБ для пациента № 9 с осложнениями в динамике длительного послеоперационного периода.

На основе полученных данных был проведен корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена для ненормального распределения, поскольку пациентов, включенных в анализ, было менее 30. Вычисленные коэффициенты корреляции показали высокую зависимость друг от друга всех использованных в исследовании параметров (dd-cfDNA, cfDNA, креатинин и СРБ). Разброс составлял 0,97–0,99 при использовании первого подхода и 0,85–0,99 – при использовании второго (рис. 4).

Обсуждение

Выполнение работы по использованию донор-специфической бесклеточной ДНК как биомаркера для оценки функции трансплантата, как правило, является долгосрочным исследованием. В нашей работе представлены результаты наблюдения за уровнем dd-cfDNA и cfDNA реципиента в раннем послеоперационном периоде для 8 реципиентов,

и только для 1 реципиента удалось проследить за соответствующими показателями не только в раннем периоде, но и далее, на протяжении 80 сут после операции.

Нужно отметить, что именно уровень dd-cfDNA при реализуемых в работе как первого, так и второго подхода отражает состояние функции почечного трансплантата. Уровень общей cfDNA реципиента и донора при использовании первого подхода анализируется по гену *RPP30* и суммарно отражает состояние как трансплантата, так и самого реципиента. Уровень cfDNA реципиента при использовании второго подхода анализируется по уровню присутствующего у реципиента в гомозиготном состоянии варианта аллеля предварительно выбранного SNP и отражает состояние только самого реципиента.

В соответствии с литературными данными у стабильных пациентов, получающих иммуносупрессивную терапию, повышенный уровень dd-cfDNA наблюдается лишь в раннем посттрансплантационном периоде и снижается до исходных значений примерно на 7–10-й день после операции [15, 16]. При отторжении трансплантата и связанном с этим нарушением его функции в результате разрушения функциональной паренхимы в общий кровоток начинает выделяться dd-cfDNA, что приводит к увеличению ее количества в организме реципиента.

Исходя из полученных нами результатов (см. рис. 1, 2) можно отметить, что у всех обследованных пациентов при динамическом наблюдении раннего послеоперационного периода происходит последовательное снижение уровня анализируемых показателей (dd-cfDNA, cfDNA, креатинина и СРБ). В частности, уровень креатинина и СРБ у реципиентов № 1–8 к окончанию раннего послеоперационного периода (4-я неделя с момента трансплантации) достигают референсных значений. Послеоперационный период у пациента № 9 по 25-е сутки

протекал без особенностей, что подтверждается снижением уровня всех исследуемых показателей (dd-cfDNA, cfDNA, креатинин и СРБ) по сравнению с соответствующими показателями сразу после операции. Однако в позднем послеоперационном периоде (35-е сутки) было отмечено появление признаков воспалительного процесса (гипертермия), диагностирован карбункул почки, связанный с инфарктом нижнего полюса донорской почки и развитием вследствие этого дисфункции трансплантата. На фоне данного процесса в анализируемых показателях мы наблюдали повышение уровня бесклеточной ДНК реципиента (50–64-й дни), которое обосновывалось острым воспалительным процессом. В дальнейшем на фоне проводимого лечения и восстановления функции трансплантата отмечалось снижение уровня креатинина и бесклеточной ДНК реципиента (cfDNA). Признаков гуморального и клеточного отторжения по данным нефробиопсии отмечено не было. Уровень донорской бесклеточной ДНК оставался стабильным.

Заключение

В данной работе впервые в России предпринята попытка использования донор-специфической бесклеточной ДНК в качестве биомаркера для оценки функции трансплантата почки. В работе

были использованы два подхода. При реализации первого используется специфическая последовательность гена *SRF* для количественной оценки мужской dd-cfDNA в плазме женщины. Второй подход предполагает предварительное проведение генотипирования реципиента и соответствующего донора с целью поиска таких SNPs, по которым они имеют различные аллельные варианты в гомозиготном состоянии. Выбранные аллельные варианты далее используются для их количественной оценки в составе cfDNA реципиента. Можно отметить, что, хотя использование первого подхода гораздо менее трудоемко и затратно по времени по сравнению с вторым подходом, оно имеет важное ограничение – применимо только для случаев, в которых донор – мужчина, а реципиент – женщина. Корреляционный анализ, проведенный по результатам с использованием как первого, так и второго подходов, свидетельствует об однонаправленном изменении уровня изучаемых показателей dd-cfDNA и cfDNA по сравнению со стандартными биохимическими показателями (креатинин, СРБ) в раннем послеоперационном периоде.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что применение метода исследования бесклеточной ДНК и поиск фракций донора в крови реципиента являются возможными и сопоставимыми с результатами биохимических маркеров.

Литература/References

1. Wolfe R.A., Ashby V.B., Milford E.L., Ojo A.O., Ettenger R.E., Agodoa L.Y., et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999; 341 (23): 1725–30.
2. Meier-Kriesche H.U., Schold J.D., Srinivas T.R., Reed A., Kaplan B. Kidney transplantation halts cardiovascular disease progression in patients with end-stage renal disease. *Am J Transplant.* 2004; 4 (10): 1662–8.
3. Rao P.S., Schaubel D.E., Jia X., Port F.K., Saran R. Survival on dialysis post-kidney transplant failure: results from the Scientific Registry of Transplant Recipients. *Am J Kidney Dis.* 2007; 49 (2): 294–300.
4. Schinstock C., Gandhi M., Cheungpasitporn W., Mitema D., Prieto M., Dean P., et al. Kidney transplant with low levels of DSA or low positive B-flow crossmatch: an underappreciated option for highly-sensitized transplant candidates. *Transplantation.* 2017; 101 (10): 2429–39.
5. Cheungpasitporn W., Kremers W.K., Lorenz E., Amer H., Cosio F.G., Stegall M.D., et al. De novo donor specific antibody following BK nephropathy: the incidence and association with antibody mediated rejection. *Clin Transplant.* 2018; 32 (3): e13194.
6. Josephson M.A. Monitoring and managing graft health in the kidney transplant recipient. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6 (7): 1774–80.
7. Nankivell B.J., Chapman J.R. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant.* 2006; 6 (9): 2006–12.
8. Jaikaransingh V., Kadambi P.V. Donor-derived cell-free DNA (ddcf-DNA) and acute antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Medicina (Kaunas).* 2021; 57 (5): 436.
9. Knight S.R., Thorne A., Faro M.L.L. Donor-specific cell-free DNA as a biomarker in solid organ transplantation. A systematic review. *Transplantation.* 2019; 103 (2): 273–83.
10. Bloom R.D., Bromberg J.S., Poggio E.D., Bunnapradist S., Langone A.J., Sood P., et al. Cell-free DNA and active rejection in kidney allografts. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28 (7): 2221–32.
11. Ding S.C., Lo Y.M.D. Cell-free DNA fragmentomics in liquid biopsy. *Diagnostics (Basel).* 2022; 12 (4): 978.
12. Sherwood K., Weimer E.T. Characteristics, properties, and potential applications of circulating cell-free DNA in clinical diagnostics: a focus on transplantation. *J Immunol Methods.* 2018; 463: 27–38.
13. Pattar S.K., Greenway S.C. Circulating nucleic acids as biomarkers for allograft injury after solid organ transplantation: current state-of-the-art. *Transplant Res Risk Manag.* 2019; 11: 17–27.
14. Beck J., Oellerich M., Schulz U., Schauer V., Reinhard L., Fuchs U., et al. Donor-derived cell-free DNA is a novel universal biomarker for allograft rejection in solid organ transplantation. *Transplant Proc.* 2015; 47 (8): 2400–3.
15. Bromberg J.S., Brennan D.C., Poggio E., Bunnapradist S., Langone A., Sood P., et al. Biological variation of donor-derived cell-free DNA in renal transplant recipients: clinical implications. *J Appl Lab Med.* 2017; 2 (3): 309–21.
16. Sigdel T.K., Vitalone M.J., Tran T.Q., Dai H., Hsieh S.C., Salvatierra O., et al. A rapid noninvasive assay for the detection of renal transplant injury. *Transplantation.* 2013; 96 (1): 97–101.
17. Beck J., Oellerich M., Schütz E. A universal droplet digital PCR approach for monitoring of graft health after transplantation using a preselected SNP set. In: *Digital PCR. Series: Methods in Molecular Biology.* Clifton, NJ, 2018; 1768: 335–48.