

**КИЇВСЬКИЙ НАУКОВИЙ ГІГІЄНИЧНИЙ ЦЕНТР МОЗ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКА НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ
ЛУГАНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
УПРАВЛІННЯ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
ЛУГАНСЬКОЇ ОБЛАСНОЇ ДЕРЖАДМІНІСТРАЦІЇ**

**АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ
АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ,
КЛІНІЧНОЇ ІМУНОЛОГІЇ
ТА МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ**

Збірник наукових праць

Випуск 19

Київ-Луганськ 2010

Ключові слова: генетичний моніторинг, частота ВВР, спадкові хвороби.

Gulenko I., Osman N. Genetic monitoring program as screening for early diagnosis of hereditary diseases.

The article is devoted effectiveness program monitoring of genetics in Kharkovskiy region to last 10 years, dynamics and analysis observation for frequency 30 defects of development and pathology of chromosomes; appreciation of effectiveness three levels preventive measures and early diagnostic of hereditary pathology.

Key words: monitoring of genetics, frequency HDD, hereditary diseases.
раскраска понравилась?

УДК 577.2:616-006

ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ХРОНІЧНИХ МІЕЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ НЕОПЛАЗМ

М.В.Дибков, С.С.Малюта, Г.Д.Телегеев

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Відділ молекулярної генетики, м. Київ, Україна*

Актуальність теми

Згідно з новим, четвертим, переглядом класифікації та діагностичних критеріїв ВОЗ, до мієлопроліферативних неоплазм (МПН) відносять: хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), хронічну нейтрофілну лейкемію, справжню поліцитемію, ідіопатичний мієлофіброз, есенціальну тромбоцитемію, хронічну еозинофілну лейкемію, мастоцитоз та хронічні мієлопроліферативні захворювання, некласифіковані [1]. В цьому ж документі наведено нові критерії для постановки діагнозів у даної групи хворих, зокрема вимагається враховувати мутаційні генетичні зміни. Введенню генетичних маркерів у діагностичну практику при мієлопроліферативних неоплазмах передували кілька відкриттів. Донедавна лише для ХМЛ було описано чіткий цитологічний маркер – філадельфійську хромосому, та відповідний молекулярний маркер – злитий ген *bcr/abl*. Але в 2005 р. кілька наукових груп [2-5] описали мутацію V617F в чотирнадцятому екзо-

ні гена *jak2*, що, як видно з її назви, призводить до заміни валіну на фенілаланін у позиції 617. Дану мутацію виявляють у 95% хворих на справжню поліцитемію і приблизно у 50% хворих на есенціальну тромбоцитемію та ідіопатичний мієлофіброз. І хоча функціональні наслідки цієї мутації не встановлені однозначно, і дана мутація є маркером для кількох захворювань, однак висока частота даної мутації дозволила включити її як важливий діагностичний критерій при діагностиці, хоча відсутність цього маркера не є критерієм для виключення МПН. Вважають, що дана мутація призводить до порушення регуляції кіназної активності, що в свою чергу призводить до конститутивної активації тирозинкінази JAK2 і збільшення кількості еритроцитів, тромбоцитів та гранулоцитів.

Якщо у пацієнтів із клінічними проявами МПН не виявлено ані *bcr/abl* перебудови, ані мутації *jak2* V617F, проводять аналіз ще декількох мутацій.

Так, при справжній поліцитемії описано ряд мутацій в 12 екзоні гена *jak2* (N542–E543DEL, F537–K539DELINSL, K539L, N538Q, K539L тощо), які виявляються у 5% хворих на справжню поліцитемію [6].

Ще одним генетичним маркером при МПН є мутації в гені *mpl* (MPL W515K та W515L) [7]. Ці мутації виявляють переважно у хворих на есенціальну тромбоцитемію та ідіопатичний мієлофіброз.

Однак слід застерегти:– виявлення описаних мутацій (особливо для Rh-негативних МПЗ) є важливим, але не самодостатнім критерієм при діагностиці мієлопроліферативних неоплазм. Тому лише в комплексі з клінічними та лабораторними методами можлива достовірна діагностика.

У даній роботі наводяться методи виявлення мутації V617F за допомогою tetra-primer amplification refractory mutation system ПЛР (T-ARMS ПЛР), а також мутацій у 12 екзоні гена *jak2* та мутацій гена *mpl* W515K та W515L за допомогою методу зворотнотранскриптажної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) та прямого секвенування.

Матеріали і методи дослідження

У роботі використовували зразки крові хворих на МПЗ (за інформованої згоди), що проходили лікування в гематологічних клініках м. Києва. РНК виділяли згідно з методом [8].

Зворотню транскрипцію проводили в об'ємі 30 мкл у суміші, що містила буфер для зворотної транскриптази, 1мМ dNTP, 0,1мкг праймера Random Hexamer Primer, 300од. зворотної транскриптази RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), 20од. РНА-зину та 1-3 мкг РНК. Реакцію проводили при 42°C протягом 1 год. і зупиняли прогріванням при 70°C 10 хв.

ЗТ-ПЛР для виявлення мутацій в 12 екзоні гена *jak2* проводили з використанням специфічних праймерів, які були підібрані за допомогою програми Genegun: для першого етапу – J-1216-1F 5'-ATGTACTTCGATGCAGTCCTAAG-3', J-1216-1R 5'-GTATGATGGCTCTGAAAGAAGG-3' (довжина амплікату – 1140 п.н.); для другого – J-1216-2F 5'-TTCCAGTTTACTAAATGCTGTCC-3' та J-1216-2R 5'-TTGAGAATCCAGAGCACTTAGAG-3' (довжина амплікату – 804 п.н.). ПЛР проводили в об'ємі 30 мкл впродовж 30 циклів (94°C – 35 сек., 55°C – 35 сек., 72°C – 1 хв. 40 сек.) з використанням 10 пмоль праймерів J-1216-1F та J-1216-1R.

Для контролю синтезу кДНК використовували праймери для виявлення β-актину (5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3' та 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3') (Invitrogen, США). Продукти ампліфікації аналізували в 2% агарозному гелі.

Для підтвердження специфічності та в разі недостатньої кількості амплікату для проведення секвенування проводили другий етап ПЛР із використанням 0,5 мкл отриманого амплікату та 10 пмоль праймерів J-1216-1F та J-1216-1R.

ЗТ-ПЛР для виявлення мутацій W515K та W515L гена *tpl* проводили з використанням специфічних праймерів, які були підібрані за допомогою програми Genegun: для першого етапу – MPL1-F 5'-ACAGGAGAAGGCCATCAGGACTGG-3' та MPL1-R 5'-CCCAGGCAAGAAGGCTGCAATC-3' (довжина амплікату – 518 п.н.); для другого – MPL2-F 5'-CCGCGATCTCGCTACCGTTTAC-3' та MPL2-R 5'-ATTTCAAGGAGGCTGGGTTCAC-3' (довжина амплікату – 353 п.н.). ПЛР проводили в об'ємі 30мкл впродовж 30 циклів (94°C – 35 сек., 55°C – 35 сек., 72°C – 45 сек.) з використанням 10 пмоль праймерів MPL1-F та MPL1-R. Продукти ампліфікації аналізували в 2% агарозному гелі. Для підтвердження специфічності та в разі недостатньої кількості амплікату для проведення секвенування проводили другий етап ПЛР із використанням 0,5 мкл отриманого амплікату та 10 пмоль праймерів MPL2-F та MPL2-R.

Очищення і секвенування продуктів ЗТ-ПЛР. В обох випадках отримані продукти ПЛР були очищені за допомогою QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) або екстракції хлороформом і переосадження етанолом та секвеновано, відповідно з використанням праймерів J-1216-1F, J-1216-1R (мутації в гені *jak2*) чи MPL2-F та MPL2-R (мутації в гені *mpl*). Отримані послідовності були проаналізовані за допомогою програм BioEdit та BLAST.

Виявлення мутації V617F за допомогою T-ARMS ПЛР. Праймери підбирали за допомогою он-лайн утиліти http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в об'ємі 30 мкл впродовж 30 циклів (94°C – 35 сек., 60°C – 40 сек., 72°C – 35 сек.) з використанням буфера для ПЛР (100мМ трісОН 8,0 50мМ KCl); 10 пмоль праймерів J4-FO (5'-GAAGAGAAGTAGGAGACTACGGTCAAC-3') та J4-RO (5'-ATAAGCAGAATA TTTTGGCACATACAT-3'); 30 пмоль праймерів J4-FI (5'-GCATTTGGTTTTAA ATTATGGAGTATATG-3') та J4-RI (5'-ACCAGAATATTCTCGTCTCCASAAAA-3'); 200мкМ dNTP та 2 мкл суміші для отримання кДНК. Продукти ампліфікації аналізували в 2% агарозному гелі.

Результати дослідження та обговорення

У попередніх роботах нами було запропоновано системи для виявлення злитого гена *bcr/abl* [9] та мутації V617F в гені *jak2* [10]. Хоча мутації в генах *mpl* та *jak2* можна проводити й без зворотної транскрипції (на ДНК), однак задля уніфікації початкових процедур виявлення всіх вищезазначених генетичних маркерів, зокрема злитого гена *bcr/abl*, ми вважаємо за доцільне саме проведення ЗТ-ПЛР аналізу.

Використання ЗТ-ПЛР та прямого секвенування має як недоліки, так і переваги. До головних недоліків можна віднести вартість та значний час (до 2-3 діб) проведення аналізу та необхідність встановлення коштовного обладнання для автоматичного чи напівавтоматичного секвенування зразків. Однак у даного підходу є і певні переваги. Так, результати такого аналізу є більш доказовими в порівнянні з іншими методами. Окрім того даний підхід дозволяє виявляти мінорні мутації у вищезгаданих генах, які описано при даних захворюваннях, особливо це стосується мутацій у гені *jak2*, для якого на сьогодні описано більше 10 подібних мутацій.

Однак для експрес-тестів більш прийнятним є метод виявлення мутації V617F за допомогою методу T-ARMS ПЛР, який базується на використанні зовнішніх геноспецифічних та алельспецифічних внутрішніх праймерів. При проведенні ПЛР із усіма чотирма праймерами напрацьовується повнорозмірний контрольний фрагмент та один чи два алельспецифічні фрагменти. Праймери до гену *jak2* було підбрано так, щоб алельспецифічні фрагменти різнились за розміром: для G алеля (норма) – 226 п.н., для T алеля (відповідає мутації V617F) – 184 п.н., контрольний геноспецифічний фрагмент – 355 п.н., і тому їх можна розрізнити за допомогою простого електрофорезу в агарозному гелі. На рис. 1 представлено електрофореграму продуктів T-ARMS ПЛР пацієнта П., 1950 р.н., хворого на справжню поліцитемію, та здорового донора.

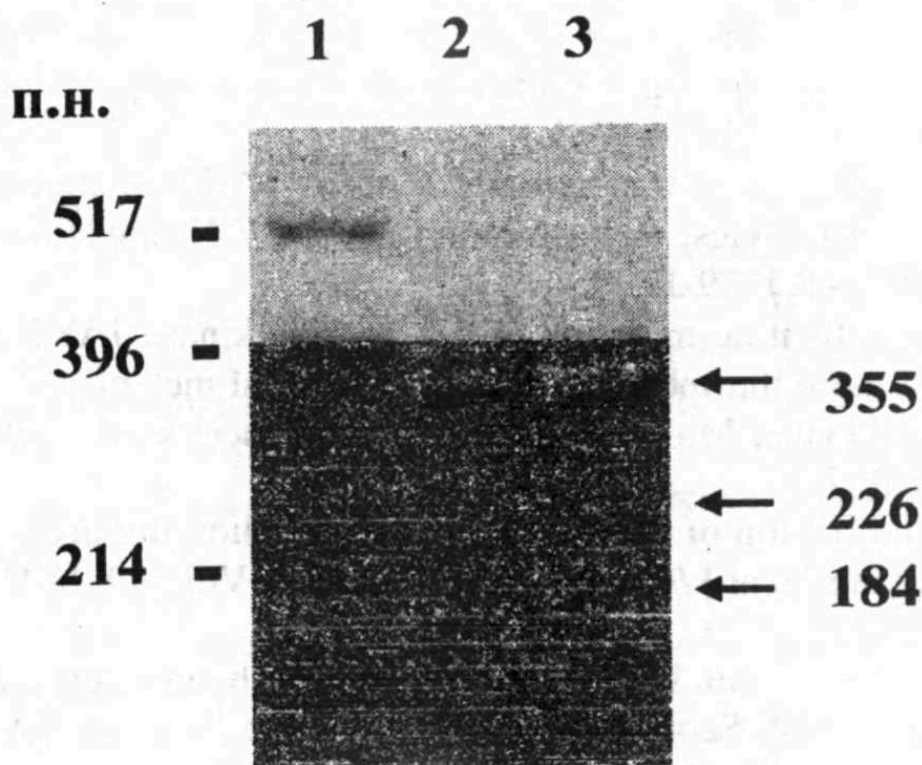


Рис. 1. Електрофореграма продуктів T-ARMS ПЛР, отриманих при дослідженні крові: 1 – маркер молекулярної ваги pUC19/HinfI; 2 – ампліфікат здорового донора (G-алель); 3 – ампліфікат хворого П. (T-алель).

Примітка: праворуч стрілками вказано розміри відповідних ампліфікованих фрагментів.

Як видно з рис. 1, в обох зразках виявляється контрольний геноспецифічний алель. Окрім того у здорового донора виявляється

лише G-алель, у хворого П. – T-алель. Тому можна стверджувати, що у пацієнта П. в гені *jak2* виявлено мутацію V617F, і діагноз, який був поставлений за клініко-гематологічними показниками, підтверджується наявністю генетичних маркерів згідно з чинними діагностичними критеріями ВОЗ [1].

Висновки

Таким чином, запропоновані методики виявлення мутацій в генах *jak2* та *mpl* можуть використовуватись для генетичної діагностики мієлопроліферативних неоплазм.

Література

1. Swerdlow S.H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / S.H. Swerdlow, E. Campo [et al.]. – 4th edition. – IARC, 2008. – 439p.
2. Baxter E.J. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders / E.J. Baxter, L.M. Scott [et al.] // *Lancet*. – 2005. – Vol.365, №9464. – P.1054-1061.
3. Kralovics R. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders / R. Kralovics, F. Passamonti [et al.] // *N.Engl.J.Med.* – 2005. – Vol.352, №17. – P.1779-1790.
4. Levine R.L. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis / R.L. Levine, M. Wadleigh [et al.] // *Cancer Cell*. – 2005. – Vol.7, №4. – P.387-397.
5. Zhao R. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera / R. Zhao, S. Xing [et al.] // *J.Biol.Chem.* – 2005. – Vol.280, №24. – P. 22788-22792.
6. Scott L.M. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis / L.M. Scott, W. Tong, R.L. Levine // *N.Engl.J.Med.* – 2007. – Vol.356, №5. – P.459-468.
7. Pardanani A.D. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients / A.D. Pardanani, R.L. Levine [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol.108, №10. – P.3472-3476.
8. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Analyt.Biochem.* – 1987. – Vol.162. – P.156-159.
9. Телегеев Г.Д. Моніторинг хронічного мієлолейкозу за допомогою молекулярно-біологічних методів. Методичні рекомендації / Г.Д. Телегеев, М.В. Дибков, М.В. Божко, Д.В. Демиденко, С.С. Малюта, Н.М. Тре-

тяк, М.В. Бондар. – К.: Республіканський центр науково-медичної інформації, 1997. – 20с.

10. Дибков М.В. Розробка тест-системи для виявлення мутації V617F гена *jak2* у хворих на хронічні мієлопроліферативні захворювання / М.В. Дибков, І.Р. Гартовська, Г.Д. Телегеев, С.С. Малюта // Наука та інновації. – 2009. – Т.5, №6. – С.59-63.

Дибков М.В., Малюта С.С., Телегеев Г.Д. Використання генетичних маркерів для діагностики хронічних мієлопроліферативних неоплазм.

Виявлення мутацій в генах *jak2* та *mpl* є важливим діагностичним критерієм при хронічних мієлопроліферативних неоплазмах. Запропоновано методики для виявлення мутацій в 12 екзоні гена *jak2*; MPL W515K та W515L гена *mpl* за допомогою ЗТ-ПЛР і прямого секвенування, а також мутації V617F гена *jak2* за допомогою Т-ARMS ПЛР.

Ключові слова: *jak2*, *mpl*, хронічні мієлопроліферативні неоплазми.

Дыбков М.В., Малюта С.С., Телегеев Г.Д. Использование генетических маркеров для диагностики хронических миелопролиферативных неоплазм.

Выявление мутаций в генах *jak2* и *mpl* является важным диагностическим критерием при хронических миелопролиферативных неоплазмах. Предложены методики для выявления мутаций в 12 экзоне гена *jak2*; MPL W515K и W515L гена *mpl* с помощью ОТ-ПЦР и прямого секвенирования, а также мутации V617F гена *jak2* с помощью Т-ARMS ПЦР.

Ключевые слова: *jak2*, *mpl*, хронические миелопролиферативные неоплазмы.

Dybkov M.V., Maliuta S.S., Telegeev G.D. Using of genetic markers for the diagnosis of chronic myeloproliferative neoplasms.

Identification of mutations in the *jak2* and *mpl* genes is an important diagnostic criterion for chronic myeloproliferative neoplasm. The methods for identifying mutations in the exon 12 *jak2* gene; MPL W515K and W515L *mpl* gene by using RT-PCR and direct sequencing and V617F mutation of the *jak2* gene by T-ARMS PCR.

Key words: *jak2*, *mpl*, chronic myeloproliferative neoplasms.

Гречанина О.Я., Бугайова О.В., Лонич М.В. Ефективність використання сучасних методів діагностики остеопорозу при синдромі Шерешевського-Тернера.....	71
Гречанина Ю.Б. Моносомия X как эпигенетическая болезнь	81
Гречанина Е.Я., Гусар В.А. Распространенность полиморфизмов C677t Mthfr И A66g Mtrr генов системы фолатного цикла в популяции Восточной Украины.....	91
Гриневич И.В., Гриневич С.А., Царук Т.А. Опыт наблюдения пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера в центре планирования семьи в г. Запорожье	98
Гуленко И.И., Осман Н.С. Генетический мониторинг как просеивающая программа для ранней диагностики наследственных болезней.....	104
Дибков М.В., Малюта С.С., Телегеев Г.Д. Використання генетичних маркерів для діагностики хронічних мієлопроліферативних неоплазм.....	109
Довженко С.П., Горовенко Н.Г. Алельний поліморфізм генів <i>TNF-A</i> та <i>CCR5</i> у жінок з України, хворих на рак молочної залози.....	116
Дружиніна О.М., Малєєва І.О., Овчинникова О.О., Котельницька О.Я., Ярова О.І. Характеристика варіабельності цитогенетичних форм синдрому Шерешевського-Тернера	127
Е.А.Дьоміна Е.А. Удосконалення первинної профілактики радіогенних пухлин людини на основі цитогенетичних досліджень.....	134
Євсєєнкова О.Г., Брішевац Л.І., Процюк Д.В., Подольська С.В., Сіренко В.Ю., Дахно Ф.В., Горовенко Н.Г. Роль застосування цитогенетичного дослідження та генетичного консультування при обстеженні подружніх пар з безпліддям, які звернулися до послуг допоміжних репродуктивних технологій.....	140
Ефремова О.А., Христич А.В., Ткачева Т.М. Новый подход к реабилитации детей с синдромом дауна.....	155

Наукове видання

**АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ
АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ,
КЛІНІЧНОЇ ІМУНОЛОГІЇ
ТА МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ**

Збірник наукових праць

Випуск 19

(українською та російською мовами)

**Відповідальний редактор
ГЕРМАНОВ Володимир Тимофійович**

Техн. редактор *О. А. Волошина*
Оригінал-макет *О.В. Асварова*

Підписано до друку 12.04.2010.

Формат 60x84 1/16. Папір типогр. Гарнітура Times.
Друк офсетний. Умов. друк. арк. 29,2. Обл. вид. арк. 30,4.
Тираж 100 екз. Вид. № . Замов. № Ціна договірна.

Видавець ЛугДМУ
91045, м. Луганськ, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 1