УДК: 616.155.392.8:577.2.575

Г.Д. ТЕЛЕГЕЄВ, А.М. ДУБРОВСЬКА, М.В. ДИБКОВ, В.М. МАЧИЛО[1], І.Р. ГАРТОВСЬКА[2]

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, м. Київ

[1] відділення гематології 2-ї обласної клінічної лікарні МОЗ України, м. Київ

[2] відділення гематології обласного онкологічного диспансеру МОЗ Україним, м. Київ

ДІАГНОСТИКА Ph' ЛЕЙКЕМІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Філадельфійська (Ph') хромосома – продукт реципрокної транслокації 9 та 22 хромосом. Виявлення цієї хромосоми багато в чому визначає прогноз та схему лікування гематологічних хворих. На молекулярному рівні утворення Ph'-хромосоми призводить до формування злитого bcr/abl гена. Даний ген виявляли методом полімеразної ланцюгової реакції в клітинах крові хворих з невизначеною клінічною картиною.

Ключові слова: *філадельфійська хромосома, гель bcr/abl, метод полімеразної ланцюгової реакції.*

The Philadelphia chromosome is a product of reciprocal translocation of 9 and 22 chromosome with subsequent fusion of abl gene on 9 chromosome with bcr gene on 22 chromosome. Ph' chromosome detection in great part determines prognosis and therapy of hematological patients. PCR was used for detection of this gene in patients with ambiguous clinic.

Key words: *Ph' chromosome, bcr/abl genes, polimeras chain reaction.*

ВСТУП

Методи діагностики лейкемій, які застосовують у повсякденній практиці, включають використання простих цитологічних критеріїв, таких як форма та розмір клітин, характер зернистості цитоплазми, ядерно-цитоплазматичне співвідношення, структура ядра тощо. Ці методи доповнюються також цитохімічними методами (визначення активності кислої фосфатази, мієлопероксидази, PAS реакція) [1]. На підставі результатів, що дають ці методи, можна встановити діагноз більшості пацієнтів.

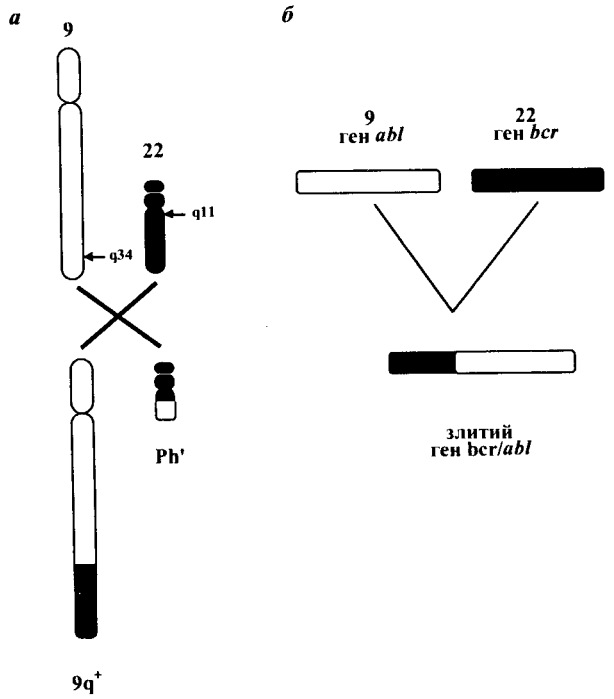
Уточнення ж природи конкретного лейкемічного клону вимагає проведення імунофенотипування та цитогенетичного аналізу. Використання моноклональних антитіл, імунофлуоресцентних та імуноферментних методів дозволяє більш точно встановлювати рідкісні форми та варіанти лейкемій і, таким чином, застосовувати відповідні протоколи лікування [2,3].

Хромосомні транслокації виявляють при більшості неоплазій людини і, переважно, саме вони зумовлюють один чи декілька етапів пухлинного розвитку.

У зв'язку з цим результати цитогенетичного аналізу, під час якого виявляють характерні аномалії (транслокації, інверсії, делеції тощо) шляхом диференційного забарвлення хромосом, мають самостійне діагностичне і прогностичне значення [4–6]. Першим подібним маркером пухлинного росту була маленька G-забарвлена хромосома, описана в 1960 р. і названа філадельфійською (Ph') [7]. Утворення даної хромосоми обумовлене реципрокною транслокацією між 9 і 22 хромосомами t (9;22) (q34;q11) [8] (мал.1а). Її виявили приблизно у 95% хворих на хронічну гранулоцитарну лейкемію, а також у 25–30% дорослих та 2–10% дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію (ГЛЛ) [9]. На молекулярному рівні утворення філадельфійской хромосоми супроводжується утворенням нового злитого bcr/abl гена (представленого на 5'-кінці ділянкою гена bcr, а на 3'-кінці – ділянкою гена abl [10] (мал.1б). Як показали численні експерименти, саме продукт транскрипції гена bcr/abl є головним етиологічним моментом у розвитку Ph+ – лейкемії. Наявність цього гена в клітинах крові та кісткового мозку дозволяє виявляти Ph' хромосому методами молекулярної біології.

На сьогодні молекулярно-біологічні методи включають методи з використанням геномних зондів [11,12], полімеразної ланцюговою реакції [13,14], флюоресценцію in situ гібридизацію (FISH) [15], "PCR in cell" [16] тощо.

Найбільш простим і чутливим є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

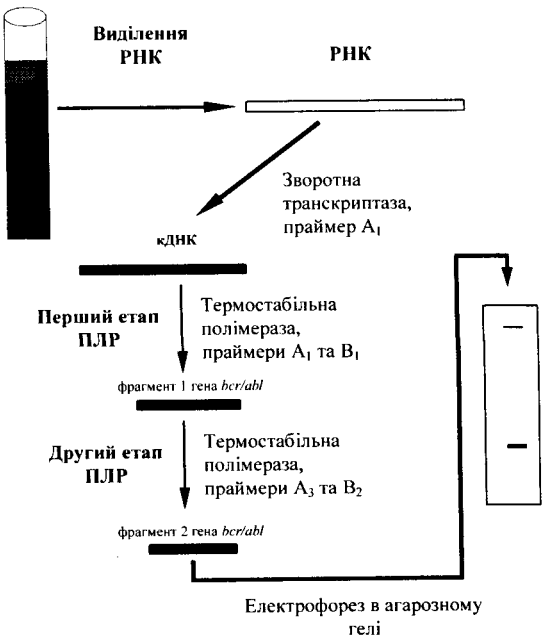


Мал.1. Схема утворення філадельфійської (Ph') хромосоми **(а)** та злитого bcr/abl гену **(б)**, який утворюється внаслідок даної хромосомної транслокації.

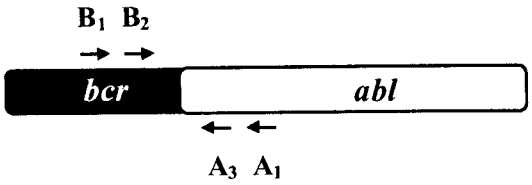
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі використовували зразки крові хворих, які лікувалися в гематологічних клініках м.Києва. На мал. 2 схематично зображено основні етапи виявлення Ph' хромосоми у клітинах крові хворих.

РНК отримували за [17]. Реакційна суміш для синтезу кДНК містила 1–5 мкг РНК, 10 pM праймера A1 (5'-TGATTATAGCCTAAGACCCGGA-3') (мал.2,3), 20 од. зворотної транскиптази M-MLV (GibcoBRL), 10–20 од. РНазіну, 1мМ dNTP, буфер для зворотної транскиптази. Загальний об'єм суміші склав 40 мкл. Синтез проводили при 37°С протягом 1 год. Аліквоти реакційної суміші (5–10мкл) використовували для проведення ампліфікації. На першому етапі проводили 30 циклів полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів A1 та B1 (5'-GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC-3') в об'ємі 30 мкл (мал.3), за умов, що рекомендовані фірмою-виготовлювачем Taq-полімерази. Температурний режим синтезу: 94°С – 18 сек, 55°С – 18 сек, 72°С – 1 хв. Далі проводили другий етап ПЛР з використанням праймерів B2 (5'-GAAGCTGCAGATGCTGACCAAC-3') та A3 (5'-TCAGACCCTGAGGCTCAAAGTC-3') (мал.3) 94°С – 24 сек, 58°С – 18 сек, 72°С – 1 хв. Продукти ампліфікації аналізували в 3% агарозному гелі.



Мал. 2. Схема виявлення гену bcr/abl методом ПЛР.



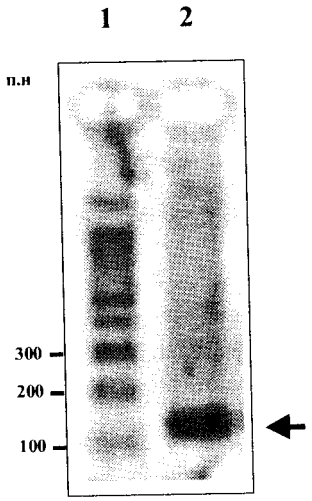
Мал. 3. Схема розміщення праймерів, що використовуються в полімеразній ланцюговій реакції для виявлення гену bcr/abl.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Полімеразна ланцюгова реакція застосовується для отримання значної кількості певних ділянок молекули ДНК. Це досягається проведенням декількох (до 40) циклів, кожен з яких складається із стадії денатурації, стадії віджигу та стадії синтезу. На стадії синтезу відбувається копіювання ДНК ланцюга (на ділянці, обмеженій спеціально підібраними праймерами) термостабільним ферментом. У нашому випадку напрацьовували ділянку гібридного гену bcr/abl. У зв'язку з тим, що розрив у генах bcr та abl відбувається на значних за розміром ділянках, це робить проблематичним застосування ДНК в полімеразній ланцюговій реакції, тому в діагностиці використовують дослідження РНК, яка має значно менший розмір. Через те ПЛР розпочинали з отримання копійної ДНК (кДНК), яку синтезували за допомогою зворотної транскриптази, використовуючи РНК як матрицю і праймер A1 як затравку (мал.2,3). Перший етап ПЛР, що проводили з використанням праймерів A1 та B1, не дав необхідної для візуального виявлення в агарозному гелі такої кількості продукту. Тому проводили другий етап ПЛР, використовуючи аліквоту ПЛР продукту з першого етапу та інші (внутрішні) праймери A3 та B2 (мал.3).

На мал. 4 представлено елекрофореграму продукту ПЛР, отриманого при дослідженні крові хворого

К. Хворий К. 1956 р.н., ліквідатор аварії на ЧАЕС. Вперше на прийомі в травні 1999 року, в гемограмі з 1992 р. – нейтрофільний лейкозитоз з тенденцією до зростання. Аналіз крові 7.07.1999 р.: Ер – $5x10^{12}$, Hb – 143 г/л, L – $11,4x10^9$, е – 2%, п – 5%, с – 66%, л – 18%, м – 10% , ШОЕ – 12 мм/год. Наступний аназіз крові 31.08.2000 р.: Ер – $5x10^{12}$, Hb – 168 г/л, тр – $250x10^9$, L – $18,9x10^9$, е – 2%, п – 7%, с – 64%, л – 20%, м – 7%, ШОЕ – 7 мм/год. Стаціонарне лікування проводили з 5.09.2000 р. по 19.09.2000 р. При надходженні: скарги за загальну слабкість, болі в суглобах. Об'єктивно: шкіра чиста, печінка та селезінка не збільшені.



Мал.4. Електрофореграма продукту ПЛР, що був отриманий при дослідженні крові хворого К.
1 – маркер молекулярних мас DNA Ladder 100bp.
2 – продукт ПЛР крові хворого К.
Стрілкою вказано фрагмент, який відповідає філадельфійській хромосомі при перебудові B2/All (розмір фрагмента 125 п.н).

Аналіз крові 6.09.2000 р.: Ер – $5,3x10^{12}$, Hb – 176 г/л, тр – $275x10^9$, L – $15,7x10^9$, е – 2%, п – 7%, с – 66%, л – 16%, м – 9% , ШОЕ – 1 мм/год.

Дослідження кісткового мозку: бласти – 2,0%, нейтроф. пром – 0,5%, мієл – 8,5%, п – 24%, с – 27,5%, еоз – 0,5%, л – 10,5%, м – 2,0%, пл. кл – 1,5%, еритробл – 0,5%, нормоцити баз. – 1,5%, нормоцити поліхр. – 4,5%, нормоцити окс. – 8,0%.

При цитохімічному дослідженні лужної фосфатази нейтрофілів не виявили.

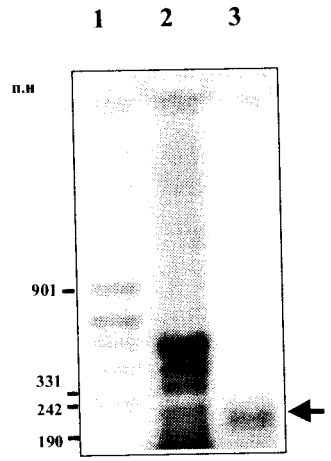
Біохімічний аналіз крові 6.09.2000 р. – незначне підвищення тимолової проби, інші показники в нормі.

УЗД: печінка та селезінка – не збільшені.

Невизначеність клінічної картини обумовило проведення тесту на наявність Ph' хромосоми. При проведенні аналізу крові методом ПЛР виявили фрагмент гену bcr/abl розміром 125 п.н. На підставі цього поставили діагноз: хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), вперше виявлена, початкова стадія.

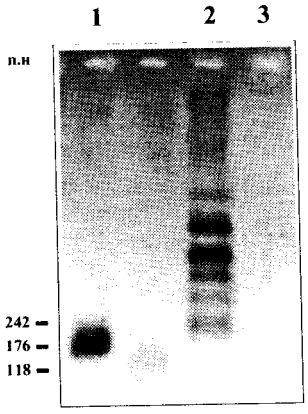
Аналогічно проводили аналіз крові хворого Є. (гостра лімфобластна лейкемія L2, не Т-клітинний варіант, І гострий період) та хворого П. з підозрою на ХМЛ.

На мал. 5 наведено електрофореграму ПЛР аналізу крові хворого Є. Виявлено перебудований фрагмент гену bcr/abl розміром 200 п.н. Виходячи з результатів аналізу, було скориговано протоколи лікування.



Мал.5. Електрофореграма продукту ПЛР, отриманого при дослідженні крові хворого Є.
1 – маркер молекулярних мас pBR322/AluI.
2 – маркер молекулярних мас pUC19/MspI.
3 – продукт ПЛР крові хворого Є.
Стрілкою вказано фрагмент, який відповідає філадельфійській хромосомі при перебудові B3/All (розмір фрагмента 200 п.н).

На мал. 6 наведено результати аналізу крові хворого П. Але, як бачимо, перебудований ген bcr/abl не було виявлено, що визначило подальшу тактику лікування хворого.



Мал.6. Електрофореграма продукту ПЛР, отриманого при дослідженні крові хворого П.
1 – фрагмент, що відповідає нормальному гену abl (176 п.н).
2 – маркер молекулярних мас pBR322/AluI.
3 – продукт ПЛР крові хворого Є.
Фрагмент, який відповідає перебудованому гену bcr/abl - відсутній.

Ці дані свідчать про високу ефективність ПЛР у діагностиці хворих з невизначеним діагнозом. Використання ПЛР дає змогу виявляти мінімальну кількість патологічних клітин (10–4 – 10–5), що дозволяє проводити ранню діагностику. Даний метод дозволяє прогнозувати подальший перебіг захворювання, оцінювати цитогенетичну ремісію та ефективність лікування.

ЛІТЕРАТУРА

1.*Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П. и др.* Цитохимия и електронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. К.: Наукова думка, 1974. 244 с.

2.*Глузман Д.Ф., Бебешко В.Г., Надгорная В.А. и др.* Эмбриональное кроветворение и гемобластозы у детей. К.: Наукова думка, 1988. 200 с.

3.*Пинчук В.Г., Глузман Д.Ф., Надгорная В.А. и др.* Иммуноцитохимические методы и моноклональные антитела в онкогематологии. К.: Наукова думка, 1990. 233 с.

4.*Boehm, T.H. Rabbits.* A chromosomal basis of lymphoid malignancy in man. E. J. Biochem 1989; 185: 1-17.

5.*Cline M.J.* The molecular basis of leukemia. The New England Journal of Medicine 1994; 330: 328-336.

6.*Rabbits T.H.* Chromosomal translocations in human cancer. Nature 1994; 372: 143-149.

7.*Nowell P.C., Hunderford D.A.* A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132: 1497-1499.

8.*Rowley J.D.* A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 1973; 243: 290-293.

9.*Телегеев Г.Д., Дыбков М.В., Карпенко О.И., Черепенко Е.И.* Молекулярные основы Ph-лейкемий и пути их лечения. Биополимеры и клетка. М., 1994: 78-92.

10.*Gishizky M.L.* Molecular mechanisms of Bcr-Abl-induced oncogenesis. Cytokines Molular Therapy 1996: S251-S261.

11.*Southern E.M.* Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electroforesis. J. Mol. Biol. 1975; 3: 503-517.

12.*Grosveld G., Verwoerd T.* T van Agthoven et al. The chronic myelocytic cell line K 562 contains a breakpoint in bcr and produces a chimeric bcr/c-abl transcript. Molecular and Cellular Biology 1986; 2: 607-616.

13.*Kawasaki E.S., Clark S.S., Coyne M.Y. et al.* Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by deletion of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988; 15: 5698-5702.

14.*Maurer J., Janssen J., Thiel E. et al.* Deletion of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction. The Lancet 1991; 8749: 1055-1058.

15.*Tkachuk D.C., Westbrook C.A., Andreeff M. et al.* Detection of bcr-Abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. Science 1990; 4980: 559-562.

16.*Testori N., Martinelli G., Farabedoli P. et al.* A new method of "in-cell reverse transciptase-polymerase chain reaction" for detection of BCR/Abl transcripts in chronic myeloid leukemia patients. Blood 1996; 9: 3884-3892.

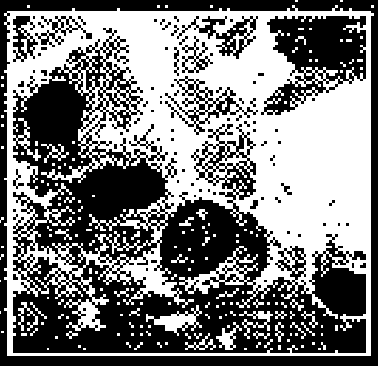
17.*Chomczynski P., Sacchi N.* Single-step method of RNA isolation by acid guanidinum thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analyt. Biochem. 1987; 162: 156-159.

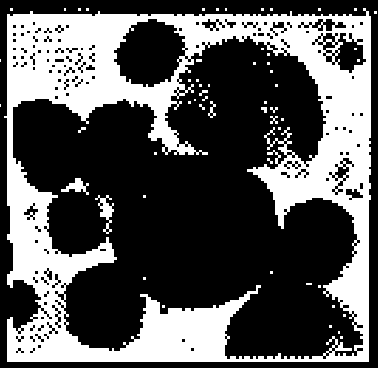
Матеріал надійшов до редакції 28.08.2000 р.

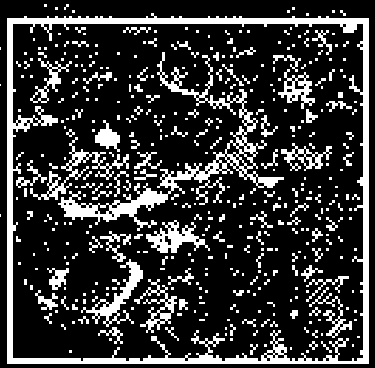
Адреса для листування:

Г.Д. Телегеєв
03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150,
тел.: 266-07-29.
Інститут молекулярної біології та генетики
НАН України.

ГЕМАТОЛОГІЯ і ТРАНСФУЗІОЛОГІЯ







УКРАЇНСЬКИЙ
НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ
МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

1/2000

Київська медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України
Інститут гематології та трансфузіології АМН України
Науковий центр радіаційної медицини АМН України
Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України

ГЕМАТОЛОГІЯ І ТРАНСФУЗІОЛОГІЯ

ГЕМАТОЛОГИЯ И ТРАНСФУЗИОЛОГИЯ • HEMATOLOGY AND TRANSPHUSIOLOGI

УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

1 (1) 2000

Головний редактор Гусєва С.А.

Редакційна колегія:
Базика Д.А., Бебешко В.Г., Бруслова К.М., Виговська Я.І., Гайдукова С.М., Дейнека С.В., Дзюблик І.В., Драник Г.М., Дягіль І.С., Зозуля І.С., Ісакова Л.М., Липкан Г.М., Логінський В.О., Масляк З.В., Матлан В.Л., Новак В.Л., Перехрестенко П.М., Романова А.Ф., Стариков А.В., Тимченко А.С., Третяк Н.М., Харченко Н.В., Чумак А.А., Шатрова К.М., Шпарик Я.В.

Рекомендовано
Вченою радою
Київської медичної академії
післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика
МОЗ України
Протокол №10 від 20.12.2000 р.

Генеральний спонсор
Представництво «ЕГІС Рт» в Україні
01133, м. Київ, Лабораторний провулок, 1
тел.: (044) 252-80-93, 252-88-73

Видавець
ПП «АРІ прес»
Свідоцтво про державну реєстрацію
КВ № 4245 від 26.05.2000 р.

Адреса редакції
03148, м. Київ,
вул. Героїв Космосу, 6
тел.: (044) 478-95-93
факс: (044) 475-61-96

Журнал «Гематолія і трансфузіологія» можна передплатити у будь-якому відділенні поштового зв`язку.

Передплатний індекс журналу – 21948

Видруковано у друкарні видавництва "Преса України",
03047, м. Київ, пр-т Перемоги, 50
Тираж – 1000 прим., замов. № 0130104

Усі права стосовно опублікованих статей залишені за видавцем.
Відповідальність за достовірність інформації, що міститься в друкованих матеріалах, несуть автори. Передруки і переклади дозволені лише з письмового дозволу редакції. Відповідальність за зміст рекламних матеріалів несе рекламодавець.

© ПП "АРІ прес", 2000

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

ВИКОРИСТАННЯ РОСТОВИХ ФАКТОРІВ У ТЕРАПІЇ ОНКОГЕМАТОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ
Дягіль І.С. 4

ІМУНОТЕРАПІЯ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНОЇ МІЄЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ
Гартовська І.Р., Гусєва С.А. 10

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ІМУНОФЕНОТИПІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА CD34+ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ПРИ МІЄЛОДЕПРЕСІЯХ І ГОСТРІЙ ЛЕЙКЕМІЇ ПІСЛЯ РАДІАЦІЙНОГО ВПЛИВУ
Базика Д.А., Бебешко В.Г., Бєляєва Н.В., Азарскова М.В., Клименко В.І. 16

ОЦІНКА ВПЛИВУ НЕГАТИВНИХ ФАКТОРІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА НА РОЗВИТОК ЛЕЙКЕМІЇ І ЛІМФОМ У ДІТЕЙ КИЇВСЬКОЇ ОБЛАСТІ ДО І ПІСЛЯ АВАРІЇ НА ЧАЕС
Бебешко В.Г., Бруслова К.М., Глузман Д.Ф., Абраменко И.В., Базика Д.А., Джуринська О.М., Цвєткова Н.М., Байда Л.К., Кучер О.В., Кузнєцова О.Е., Мочанова Н.Ю., Євко О.І., Єлагін В.В., Галкіна С.Г., Донська С.Б. 22

ОСОБЛИВОСТІ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ЗМІН У ХВОРИХ НА ГОСТРУ МІЄЛОМОНОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ (ГМЛ-М4 ЗА ФАБ КЛАСИФІКАЦІЄЮ)
Вакульчук О.М., Третяк Н.М., Ісакова Л.М., Коваль А.І., Калініна С.Ю., Мосійчук А., Басова О.В., Вовк Н.І., Мнішенко В.М., Перехрестенко Т.П. 29

ЗМІНИ СПЕКТРУ ФРАКЦІЙ СИРОВАТКОВОГО БІЛКА ДИСК-ЕЛЕКТРОФОРЕГРАМИ В ПОЛІАКРИЛАМІДНОМУ ГЕЛІ ТА ВМІСТУ IgG, IgA, IgM У ЦИХ ФРАКЦІЯХ ПРИ АНЕМІЯХ ВАГІТНИХ ТА ЇХНЬОМУ КОМПЛЕКСНОМУ ЛІКУВАННІ
Макарчук О.М. 34

ДІАГНОСТИКА Ph' ЛЕЙКЕМІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ
Телегеєв Г.Д., Дубровська А.М., Дибков М.В., Мачило В.М., Гартовська І.Р. 37

ДЕТОКСИКАЦІЙНА ТЕРАПІЯ ХВОРИХ З УРАЖЕННЯМИ ПЕЧІНКИ
Стариков А.В. 41

ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ТЕРМІНОЛОГІЮ І КЛАСИФІКАЦІЮ МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНОГО СИНДРОМУ
Ісакова Л.М. 44

ВІРУСНА БЕЗПЕКА ТРАНСФУЗІЙ КРОВІ, КЛІТИННИХ КОМПОНЕНТІВ ТА БІЛКОВИХ ПРЕПАРАТІВ
Тимченко А.С. 48

НОВІ ТЕХНОЛОГІЇ В РІШЕННІ ПРОБЛЕМИ ІНФОРМАЦІЙНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ СИСТЕМИ УПРАВЛІННЯ НАЦІОНАЛЬНОЇ СЛУЖБИ КРОВІ УКРАЇНИ
Вахненко Л.М. 53

ДАЙДЖЕСТ

ІНФОРМАЦІЯ ПРО РОСІЙСЬКУ НАУКОВО-ПРАКТИЧНУ КОНФЕРЕНЦІЮ «АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ ГЕМАТОЛОГІЇ І ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ»
Ісакова Л.М. 56

ЛЕКЦІЯ

УСПІХИ І ПЕРСПЕКТИВИ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНОГО МІЄЛОЛЕЙКОЗУ
Рукавицин О.А. 61

ОФІЦІЙНА ІНФОРМАЦІЯ

IV З'ЇЗДУ ГЕМАТОЛОГІВ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІВ УКРАЇНИ 67

РЕДАКЦІЙНА ІНФОРМАЦІЯ

ВИМОГИ ДО АВТОРІВ 68