

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА СИСТЕМА ДІАГНОСТИКИ ХРОНІЧНИХ МІЕЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ НОВОУТВОРЕНЬ

Використання молекулярно-генетичних маркерів вже є невід'ємною складовою частиною комплексних систем для діагностики та клінічного контролю лікування багатьох захворювань людини. Зокрема для мієлопроліферативних новоутворень дотепер описано когорту генетичних змін, багато з яких є не тільки генетичними маркерами даної групи захворювань, а є причиною їх розвитку. Ці зміни включають хромосомні транслокації, що призводять до утворення химерних білків, а також мутації, що приводять до зміни контролю активації білків, важливих для диференціації гемопоетичних клітин-попередників. До групи мієлопроліферативних новоутворень (МН) відносять захворювання, що характеризуються клональними процесами, котрі виникають внаслідок трансформації поліпотентної гемопоетичної стовбурової клітини. Характерною для них є проліферація клітин однієї чи кількох ліній мієлопоезу (гранулоцитів, мегакаріоцитів, еритроїдних елементів), що призводить до множинної гіперплазії. Мієлопроліферативні новоутворення виявляють переважно у дорослих після 50 років, однак діагностують і у дітей. Частота всіх типів МН за даними ВООЗ становить 6–10 на 100 тис. населення щорічно. Згідно з останньою редакцією класифікації ВООЗ [1] виділяють такі форми МН – хронічний мієлолейкоз, BCR-ABL1-позитивний (ХМЛ); хронічний нейтрофільний лейкоз (ХНЛ); справжня поліцитемія (СП); есенціальна тромбоцитемія (ЕТ); первинний мієлофіброз (ПМФ); хронічний еозинофільний лейкоз, неспецифікований іншим чином; мастоцитоз; мієлопроліферативне захворювання некласифіковане. Зазвичай діагностика хронічного нейтрофільного лейкозу та мастоцитозу не є складною за умови використання цитоморфологічних та цитохімічних підходів. Диференційна діагностика інших форм мієлопроліферативних новоутворень, зокрема хронічного мієлолейкозу, справжньої поліцитемії, первинного мієлофіброзу, есен-

ціальної тромбоцитемії та мієлопроліферативне новоутворення некласифіковане за допомогою вищезгаданих методів значно утруднене оскільки всі ці захворювання мають клінічні, гематологічні, та морфоцитологічні ознаки, що або є спільними, або перекриваються. Саме тому згідно з сучасною класифікацією ВООЗ 2008 р. [1] для підтвердження діагнозу було введено цілий ряд молекулярних маркерів як основних критеріїв диференційної діагностики мієлопроліферативних новоутворень. Одним з таких маркерів є філадельфійська хромосома, яка є першим достовірно встановленим маркером злоскісних перетворень гемопоетичних тканин людини, і яку описано ще в 1960 році. На молекулярному рівні її можна виявити за присутністю химерного гена *bcr/abl*. У 2005 році кілька груп дослідників [2–6] майже одночасно описали точкову мутацію 1849G > T в чотирнадцятому екзоні гена *jak2* на хромосомі 9p24, що призводила до амінокислотної заміни V617F, тобто валіну на фенілаланін у позиції 617. Дана мутація виявляється у 90–95 % хворих на справжню поліцитемію і приблизно у 50 % хворих на есенціальну тромбоцитемію та ідіопатичний мієлофіброз. Вважають, що на функціональному рівні ця заміна призводить до втрати регуляції та конститутивної активації JAK2 тирозинкінази. Це у свою чергу призводить до втрати регуляції JAK-STAT сигнального шляху зокрема викликає активацію трансдуктора сигналів та активатора транскрипції (STAT), мітогенактивованої протеїнкінази (МАРК) і фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K), які викликають трансформацію і проліферацію гемопоетичних клітин-попередників. У пацієнтів з клінічними ознаками справжньої поліцитемії у яких не виявляється мутація V617F (приблизно 5 % випадків СП) описано ряд змін в 12 екзоні гена *jak2*, що призводять до амінокислотних заміни чи делецій (K539L, H538QK539L, F537–K539delinsL тощо) [7]. І, нарешті, у частини хворих на есенціальну тромбоцитемію (ЕТ) та первинний мієлофіброз

(ПМФ) виявляють мутації в 10му екзоні гена рецептора тромбопоєтину *mpl*, що призводять до амінокислотних змін W515L, W515K [8], S505N тощо.

Окрім діагностики, молекулярно-генетичні методи відіграють все більшу роль у підборі оптимальних схем лікування новоутворень людини. Так, показано, що ряд мутацій у кіназному домені химерного гена *bcr/abl*, зокрема амінокислотної T315I заміни, призводить до утворення лікарської стійкості до специфічного інгібітору BCR-ABL тирозинкінази – іматинібу (Imatinib, STI571) [9]. Тому, визначення подібних змін до початку лікування є вкрай важливим.

Матеріали та методи

У роботі використовували (за інформованої згоди) зразки крові пацієнтів з попереднім діагнозом МН, що знаходилися на обстеженні і лікуванні в Київській міській клінічній лікарні № 9, Київській обласній клінічній лікарні № 1, Національному Інституті раку та в гематологічних відділеннях клінічних лікарень обласних центрів України. РНК отримували за Chomczynski, Sacchi [10]. Виявлення генетичних змін при мієлопроліферативних новоутвореннях проводили за допомогою запропонованих нами тест-систем: химерного гена *bcr/abl* – за допомогою зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) із специфічними праймерами [11, 12]; мутацію V617F гена *jak2* – за допомогою тетрамерної ПЛР з алейспецифічними праймерами [13, 14]; мутації в 12–16 екзонах гена *jak2* [15], мутації гена *mpl* [15] – за допомогою ЗТ-ПЛР та прямого сиквенування продуктів ПЛР. Для виявлення мутацій в *abl* ділянці химерного гена *bcr/abl* було підбрано специфічні олігонуклеотидні праймери 5'- GTGTGTGAAACTCCAGACTGTCC 5'- CATGCGGTAGTCCTTCTCTAGC (довжина ампліфікату — 1423 п.н.) та 5'- CAATGCCGCTGAGTATCTGCTG 5'- GAGAACTTGTGTAGGCCAGGCTC (довжина ампліфікату – 849 п.н) і також проводили ЗТ-ПЛР та пряме сиквенування продуктів ПЛР.

Результати та обговорення

Донедавна для аналізу генетичних змін, які відбуваються у хворих зі злюкисними

новоутвореннями використовували каріотипування, яке дозволяє виявляти хромосомні перебудови, делеції, інверсії тощо. Даний метод і сьогодні є обов'язковим при клінічних обстеженнях пацієнтів з даним типом захворювання, оскільки він дозволяє проаналізувати каріотип хворого і виявляти додаткові хромосомні порушення. Поряд із цим, він має значні обмеження, насамперед через достатньо низьку чутливість та необхідність, в більшості випадків, проведення пункції кісткового мозку. Тому зазвичай використовують менш інвазивні методи діагностики та контролю лікування хворих зі злюкисними новоутвореннями. Насамперед, це стосується використання полімеразної ланцюгової реакції. Хоча виявлення деяких мутацій при аналізі зразків крові хворих із мієлопроліферативними новоутвореннями можливо також без проведення зворотної транскрипції (мутації *jak2* V617F, мутацій в гені *mpl*), однак в більшості випадків необхідно також проводити виявлення злитого гена *bcr/abl*. А цей аналіз, внаслідок особливостей будови химерного гена (кілька точок розривів в значних за протяжністю інтронах) проводиться виключно за допомогою ЗТ-ПЛР, тому нами було прийнято за доцільне не проводити дві окремі процедури виділення РНК та ДНК, а проводити уніфіковану процедуру виділення РНК та отримання кДНК як для виявлення злитого гена *bcr/abl*, так і мутацій генів *jak2*, *mpl*, кіназного домену *abl* за допомогою ПЛР. Окрім того, для мажорної мутації V617F гена *jak2* в попередніх роботах [13, 14] нами було запропоновано використання тетрамерної полімеразної ланцюгової реакції з алейспецифічними праймерами, який дозволяє виявити мутацію за розміром отриманих ампліфікатів в простому агарозному гелі і характеризується високою чутливістю (мінімальна кількість клітин з мутацією 0,5–5 %).

Виходячи з вищезазначеного, на рис. наведено запропоновану нами схему молекулярно-генетичної діагностики та оптимізації протоколів лікування мієлопроліферативних новоутворень.

Запропонована система була апробована та впроваджена в клінічну практику онкогематологічних відділень м. Києва і ряду обласних центрів України.

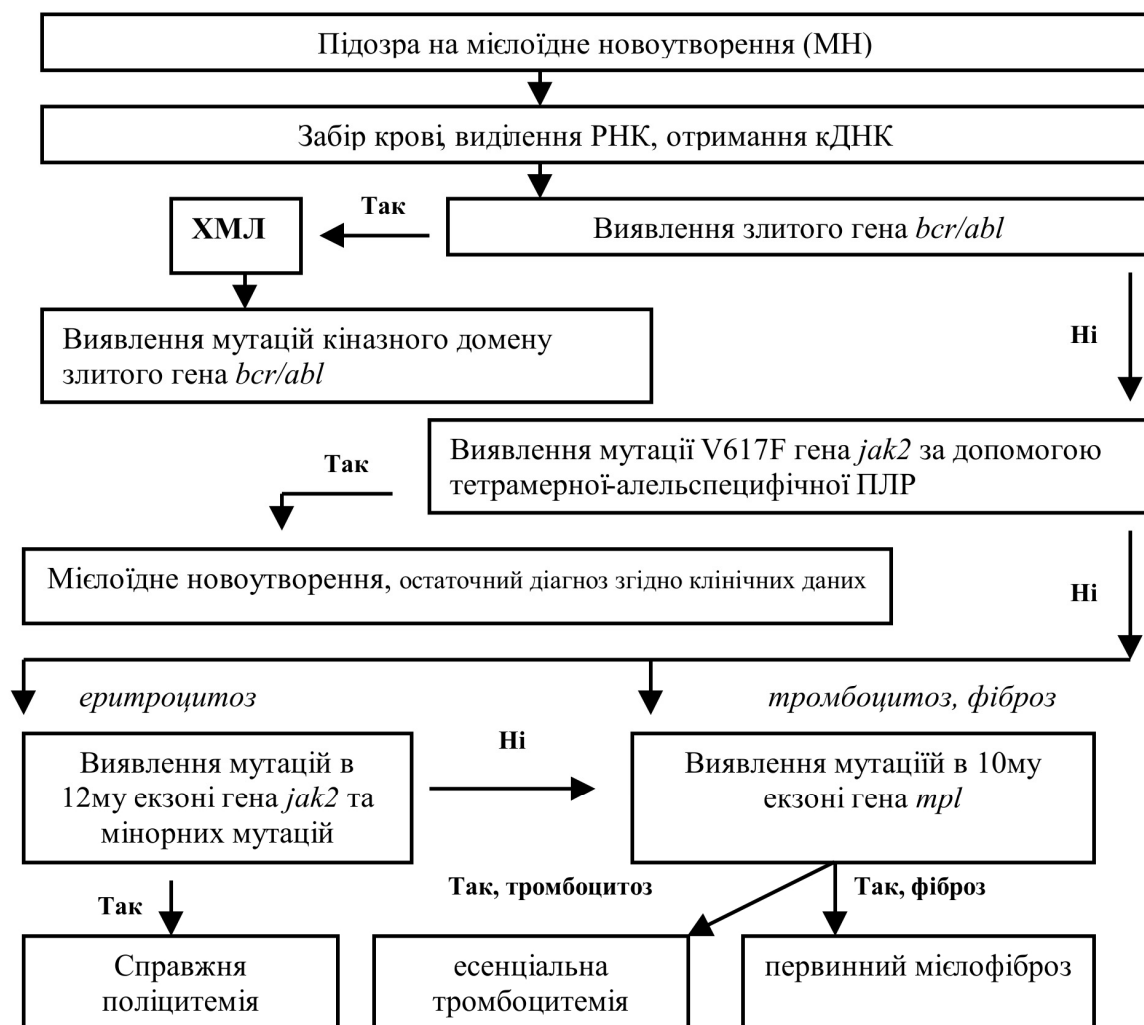


Рис. Схема молекулярно-генетичної діагностики та оптимізації схем лікування мієлопроліферативних новоутворень

Висновки

Молекулярно-генетичний аналіз займає центральне місце в діагностиці та клінічному веденні хворих із мієлоїдними новоутвореннями і дозволяє, у поєднанні з урахуванням клінічних, цитогенетичних та гістохімічних даних, проводити діагностику, вибір оптимальних схем лікування та контролювати стан пацієнтів під час лікування та ремісії.

Робота частково підтримана завдяки науковим проектам НАН України № 42/2010, 42/2011 «Вивчення молекулярно-генетичних змін при мієлопроліферативних захворюваннях і їх використання у клінічній діагностиці» та науково-технічного (інноваційного) проекту НАН України № 41/2012 «Комплексна діагностика мієлопроліферативних захворювань в обласних онкологічних центрах».

Література

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. – Lyon: IARC Press. – 2008. – 439 p.
2. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swanton S., Vassiliou G.S., Bench A.J., Boyd E.M., Curtin N., Scott M.A., Erber W.N., Green A.R. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders // Lancet. – 2005. – 365, N 9464. – P. 1054–1061.
3. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., Teo S.S., Tiedt R., Passweg J.R., Tichelli A., Cazzola M., Skoda R.C. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders // N. Engl. J. Med. – 2005. – 352, N 17. – P. 1779–1790.

4. Levine R.L., Wadleigh M., Coombs J. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis // *Cancer Cell*. – 2005. – 7, N 4. – P. 387–397.
5. Zhao R., Xing S., Li Z., Fu X., Li Q., Krantz S.B., Zhao Z.J. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera // *J. Biol. Chem.* – 2005. – 280, N 24. – P. 22788–22792.
6. James C., Ugo V., Le Couedic J.P., Delhommeau F., Lacout C., Garzon L., Raslova H., Berger R., Bennaceur-Griscelli A., Villeval J.L., Constantinescu S.N., Casadevall N., Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera // *Nature*. – 2005. – 434. – P. 1144–1148.
7. Scott L.M., Tong W., Levine R.L. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – 356, N 5. – P. 459–468.
8. Pardanani A.D., Levine R.L., Lasho T., Pikman Y., Mesa R.A., Wadleigh M., Steensma D.P., Elliott M.A., Wolanskyj A.P., Hogan W.J., McClure R.F., Litzow M.R., Gilliland D.G., Tefferi A.M. PL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients // *Blood*. – 2006. – 15, 108 (10). – P. 3472–3479.
9. Bixby D, Talpaz M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. – 2009. – P. 461–476.
10. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.* – 1987. – 162. – P. 156–159.
11. Малюта С.С., Дибков М.В., Телегеев Г.Д., Мірошніченко Д.О. Спосіб діагностики Ph'лейкемії за допомогою специфічних праймерів. Деклараційний патент на корисну модель UA № 10385 від 15.11.2005. Бюл. № 11.
12. Малюта С.С., Телегеев Г.Д., Дибков М.В., Мірошніченко Д.О., Єльська Г.В. Розробка тест-системи для діагностики Ph-лейкемії за допомогою полімеразної ланцюгової реакції // *Наука та інновації*. – 2005. – 1, № 3, С. 70–75.
13. Дибков М.В., Малюта С.С., Телегеев Г.Д. Виявлення мутації V617F в гені *jak2* хворих на хронічні мієлопроліферативні неоплазми за допомогою T-ARMS ПЛР // *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць*. – Київ: Логос, 2010. – 9. – С. 408–411.
14. Коваль С.В., Завелевич М.П., Дибков М.В., Телегеев Г.Д., Поліщук Л.О. Спосіб виявлення мутації V617F гена *jak2* за допомогою алейспецифічних праймерів. Патент на корисну модель UA № 81257 від 25.06.2013. Бюл. № 12.
15. Дибков М.В., Малюта С.С., Телегеев Г.Д. Використання генетичних маркерів для діагностики хронічних мієлопроліферативних неоплазм // *Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики. Збірник наукових праць*. – Київ-Луганськ, 2010. – Вип. 19. – С. 109–115.

DYBKOV M.V.¹, **ZAVELEVICH M.P.**², **GLUZMAN D.F.**², **POLISHCHUK L.O.**¹, **MALYUTA O.V.**¹, **MALIUTA S.S.**¹, **TELEGEEV G.D.**¹

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: m.v.dybkov@imbg.org.ua*

² *R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology Oncology and Radiobiology National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 22*

THE MOLECULAR-GENETIC SYSTEM FOR DIAGNOSTICS MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

Aims. The myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a group of diseases characterized by the rapid growth of abnormal uncontrolled proliferation myeloid cells. The definition of specific molecular-genetic abnormalities is important for diagnosis and treatment. **Methods.** Fusion genes *bcr-abl1* was detected by nested RT-PCR. Mutation V617F genes *jak2* was detected by T-ARMS PCR. Mutation of 12 exon gene *jak2*, exon 10 gene *mpl*, *abl* domain gene *bcr/abl* were detected by RT-PCR and direct sequencing. **Results.** Samples of blood of patients with different type MPNs were analyzed by the molecular-genetic system for diagnostics myeloproliferative neoplasms. **Conclusions.** Molecular genetic analysis is central to the diagnosis and clinical management of patients with myeloid neoplasms. It allows, in combination with clinical, cytogenetic and histochemical data to diagnose, choose the optimal treatment regimen and monitor the status of patients during treatment and remission.

Key words: myeloproliferative neoplasms; PCR; *bcr/abl*, *jak2*, *mpl* genes; mutation.