

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра защиты и современных технологий мониторинга лесов

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

И. Е. Ямских

подпись

«_____» _____ 20__ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозом

06.04.01 Биология

06.04.01.06 Геномика и биоинформатика

Научный руководитель _____
подпись, дата

к. б. н. Т.Н. Субботина

Выпускник _____
подпись, дата

А.А. Карнюшка

Рецензент _____
подпись, дата

профессор, д-р мед. наук
Ю.И. Гринштейн

Красноярск 2019

АННОТАЦИЯ

Эритроцитозом называют патологическое состояние, характеризующееся увеличением количества эритроцитов, концентрации гемоглобина (Hb) и уровня гематокрита (Ht). Причины эритроцитоза разнообразны и могут быть в целом разделены на первичные и вторичные, которые в свою очередь делятся на врожденные и приобретённые.

При проведении дифференциальной диагностики эритроцитозов с целью исключения такого клонального заболевания как истинная полицитемия необходимым этапом, согласно ВОЗ, является анализ на наличие мутаций в гене JAK2 в 12 и 14 экзонах.

Важно отметить, что в последнее время в литературе встречаются данные о редких случаях выявления мутаций в гене CALR у пациентов с первичным приобретённым эритроцитозом или истинной полицитемией, тогда как обычно CALR мутации ассоциированы с такими фенотипическими вариантами хронических миелопролиферативных неоплазм (ХМН), как эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и миелофиброз (МФ). Вследствие этого ставится вопрос о необходимости проведения анализа мутаций в гене CALR пациентам с эритроцитозом, а также внесением дополнений в алгоритм генетического исследования пациентов с эритроцитозом. Кроме этого, для пациентов отрицательных по JAK2 и CALR, у которых не было выявлено мутаций ответственных за развитие клонального заболевания, необходимо проводить исследование в генах кислород – чувствительного пути (EPOR, VHL, HIF2 α), которые участвуют в развитие различных типах семейного эритроцитоза (ЕСТУ1 – 4)

Цель данной работы – пересмотреть и дополнить алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозом.

Анализ мутаций в гене CALR у пациентов с эритроцитозом проводили с использованием гетеродуплексного анализа и с детекцией продуктов амплификации в вертикальном ПААГ. Исследование на наличие мутаций в генах EPOR, VHL, HIF2 α , ответственных за развитие первичного и вторичного эритроцитозов проводили с использованием секвенирования по Сенгеру.

В ходе работы была разработана технология исследования мутаций в гене CALR методом гетеродуплексного анализа и с детекцией продуктов амплификации в вертикальном ПААГ, а также в генах EPOR, VHL, HIF2 α методом секвенирования по Сенгеру для дифференциальной диагностики эритроцитозов.

Из 38 пациентов с эритроцитозами неясной этиологии, отобранных за период 2012–2016 гг (путем исключения пациентов с выявленными соматическими мутациями в 14 и 12 экзонах гена JAK2) диагнозы были уточнены для 8 человек. Так, для одного из 8-ми пациентов был подтвержден диагноз истинная полицитемия (клональное онкогематологическое заболевание – рак крови), а у других 7-ми пациентов выявлены мутации, ассоциированные с различными типами семейных эритроцитозов, в частности: для двух пациентов подтвержден диагноз семейного эритроцитоза первого типа (ЕСТУ1), для

других двух пациентов подтвержден диагноз семейного эритроцитоза второго типа (ЕСТУ2), и для трёх пациентов подтвержден диагноз семейного эритроцитоза четвертого типа (ЕСТУ4).

Ключевые слова: СЕМЕЙНЫЙ ЭРИТРОЦИТОЗ, ИСТИННАЯ ПОЛИЦИТЕМИЯ, СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ, CALR, EPOR, VHL, HIF2 α , ГЕТЕРОДУПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ, ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ВЕРТИКАЛЬНОМ ПААГ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЕНГЕРУ.

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозом» содержит 60 страницы текстового документа, 22 иллюстрации, 19 таблиц и 56 использованных источников.

СЕМЕЙНЫЙ ЭРИТРОЦИТОЗ, ИСТИННАЯ ПОЛИЦИТЕМИЯ, СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ, CALR, EPOR, VHL, HIF2 α , ГЕТЕРОДУПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ, ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ВЕРТИКАЛЬНОМ ПААГ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЕНГЕРУ.

Цель работы – пересмотреть и дополнить алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозом.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать технологию с использованием гетеродуплексного анализа и с детекцией продуктов амплификации в вертикальном ПААГ. для скрининговой качественной оценки наличия соматических мутаций в гене CALR с целью выявления первичного приобретённого эритроцитоза или Истинной полицитемии.

2. Разработать технологии с использованием секвенирования по Сенгеру для анализа мутаций в генах EPOR, VHL, HIF2 α с целью определения типа и группы семейного эритроцитоза.

3. Пересмотреть алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозами с целью дифференциальной диагностики клональных и неклональных заболеваний.

4. Проанализировать ДНК пациентов с высокой клинико-гематологической вероятностью наличия одного из типов эритроцитозов с использованием предложенного алгоритма.

Актуальность диссертационной работы заключается в том, что в России, и, в частности, в г. Красноярске и крае достаточно представительная группа пациентов с эритроцитозами после проведения стандартных диагностических процедур остаются без точно установленного диагноза и типа эритроцитоза. Внедрение в последние годы молекулярно-генетических методов для выявления основных драйверных соматических мутаций в гене JAK2 позволило значительно улучшить дифференциальную диагностику по выявлению пациентов с клональным заболеванием – истинной полицитемией. В то же время, те пациенты, у которых не выявлены данные мутации так и остаются без четко установленного диагноза и имеют неопределенный диагноз «эритроцитоз неясной этиологии». Поскольку, кроме клонального процесса причинами эритроцитозов могут быть и другие процессы, например мутации в генах кислород – чувствительного пути, и на сегодняшний день в литературе описано много случаев семейных эритроцитозов, ассоциированных с герминальными мутациями в генах EPOR, VHL, HIF2 α , которые вовлечены в созревание, дифференцировку эритроидного ростка, а также в клеточный ответ в условиях гипоксии. В связи с этим, очень важным является проведение комплексного молекулярно–генетического анализа по выявлению таких уже известных или новых мутаций. В связи с этим актуально пересмотреть алгоритм генетического

обследования пациентов с эритроцитозом и внести необходимые правки, которые помогут врачам – гематологам правильно поставить диагноз пациентам.

В ходе работы были внесены правки в алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозом, разработана технология исследования мутаций в гене CALR с использованием гетеродуплексного анализа и с детекцией продуктов амплификации в вертикальном ПААГ, технология исследования мутаций в генах кислород – чувствительного пути (EPOR, VHL, HIF2 α) методом секвенирования по Сенгеру, а также проанализированы 38 пациентов с эритроцитозом с использованием пересмотренного алгоритма.

ABSTRACT

Master's thesis on the topic «Algorithm of genetic examination of patients with erythrocytosis» contains 60 pages of a text document, 22 illustrations, 19 tables and 56 references.

FAMILIAL ERYTHROCYTOSIS, POLYCYTEMIA VERA, SOMATIC MUTATIONS, CALR, EPOR, VHL, HIF2 α , HETERODUPLEX ANALYSIS, ELECTROPHORESIS IN VERTICAL PAGE, SEQUENCING BY SUNGER.

The aim of the work is to review and supplement the algorithm of genetic examination of patients with erythrocytosis.

Based on the aim, the following tasks were formulated:

1. To develop technologies using heteroduplex analysis in vertical PAAG for screening qualitative assessment of the presence of somatic mutations in the CARL gene in order to identify primary acquired erythrocytosis or polycythemia vera;
2. To develop technologies using Sanger sequencing to analyze mutations in the EPOR, VHL, HIF2 α genes to determine the type and group of familial erythrocytosis.
3. To review the algorithm of genetic examination of patients with erythrocytosis for differential diagnosis.
4. To analyze the DNA of patients with high clinical and hematological probability for the presence of one of the types of erythrocytosis using the proposed algorithm.

The relevance of the thesis is that in Russia, and, in particular, in the city of Krasnoyarsk and the region, a fairly representative group of patients with erythrocytosis after standard diagnostic procedures are left without a precisely established diagnosis and type of erythrocytosis. The introduction of molecular genetic methods in recent years to identify the main driver somatic mutations in the JAK2 gene has significantly improved the differential diagnosis in identifying patients with clonal disease – polycythemia vera. At the same time, those patients who have not identified these mutations and remain without a clearly established diagnosis and have an uncertain diagnosis of "erythrocytosis of unknown etiology." Since, apart from the clonal process, other processes can cause the erythrocytosis, for example, mutations in the oxygen genes of the sensitive path, and today many cases of familial erythrocytosis associated with germinal mutations in the EPOR, VHL, HIF2 α genes that are involved in maturation, are described in the literature. differentiation of erythroid germ, as well as in the cellular response under hypoxic conditions. In this regard, it is very important to conduct a comprehensive molecular – genetic analysis to identify such already known or new mutations. In this regard, it is important to review the algorithm of genetic examination of patients with erythrocytosis and to make the necessary changes that will help hematologists correctly diagnose patients.

In the course of work, changes were made to the algorithm of genetic examination of patients with erythrocytosis, the technology for studying mutations in the CALR gene was developed using heteroduplex analysis and with detection of

amplification products in vertical PAAG, the technology for studying mutations in oxygen-sensitive genes (EPOR, VHL, HIF2 α) Sanger sequencing method, and 38 patients with erythrocytosis were analyzed using the revised algorithm.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	10
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	12
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Регуляция эритропоэза.....	12
1.2 Классификация эритроцитозов.....	14
1.3 Хронические миелопролиферативные новообразования.....	16
1.4 Первичный врожденный эритроцитоз первого типа (ЕСТУ1).....	17
1.5 Первичный приобретенный эритроцитоз или Истинная полицитемия..	20
1.6 Вторичный врожденный эритроцитоз второго типа (ЕСТУ2).....	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	26
2.1 Объект исследования.....	26
2.2 Выделение ДНК из клинического материала с использованием реагента «ДНК-сорб-В» ИнтерЛабСервис.....	26
2.3 Выделение ДНК с использованием набора «Gene JET Whole Blood Genomic DNA Purification», Thermo Fisher Scientific.....	28
2.4 Измерение концентрации ДНК на приборе Qubit (Invitrogen) с использованием набора реагентов Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit.....	29
2.5 Качественный анализ на наличие мутаций в 9 экзоне гена CALR.....	30
2.5.1 Проведение ПЦР для анализа мутаций в 9 экзоне гена CALR.....	30
2.5.2 Электрофоретическая детекция продуктов амплификации.....	31
2.6 Анализ на наличие мутаций в генах кислород – чувствительного пути на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США).....	32
2.6.1 Проведение первой ПЦР для анализа мутаций в 8 экзоне гена EPOR..	32
2.6.2 Проведение первой ПЦР для анализа мутаций во 2 и 3 экзонах гена VHL.....	33
2.6.3 Проведение первой ПЦР для анализа мутаций в 9 и 12 экзонах гена HIF2 α	34
2.6.4 Чистка продукта ПЦР с использованием реагента ExoSAP-IT.....	36
2.6.5 Проведение секвенирующей ПЦР.....	37

2.6.6. Очистка сиквенс – продукта с использованием набора BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США).....	37
2.6.7. Проведение очистки ПЦР – продукта после секвенирующей реакции изопропиловым спиртом.....	38
2.6.7. Специализированные программы для обработки полученных результатов	38
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ	40
3.1 Критерии отбора пациентов для анализа герминальных мутаций, ассоциированных с семейным эритроцитозом в генах кислород–чувствительного пути: EPOR, HIF2 α , VHL.....	40
3.2 Анализ мутаций в генах, ассоциированных с миелоидными заболеваниями у пациентов с эритроцитозом с использованием миелоидной панели фирмы SOPHIA GENETICS.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Дополнительный анализ соматических мутаций в гене CALR с целью дифференциальной диагностики истинной полицитемии и случаев вторичного эритроцитоза.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Результаты анализа мутаций в гене EPOR среди пациентов с эритроцитозами.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.5 Результаты анализа мутаций в гене VHL среди пациентов с эритроцитозами.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.6 Результаты анализа мутаций в гене HIF2 α среди пациентов с эритроцитозами.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.7 Алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозом	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	57

ВВЕДЕНИЕ

В среднем взрослый человек ежедневно производит около 2,4 миллиона эритроцитов, богатых железосодержащим белком – гемоглобином (Hb), который ответственен за передачу кислорода к тканям. В организме человека существуют гомеостатические механизмы для обеспечения достаточного продуцирования эритроцитов. Любой дисбаланс в механизмах гомеостаза может привести к избыточной продукции эритроцитов [1].

Эритроцитозом называют патологическое состояние, характеризующееся увеличением количества эритроцитов, концентрации гемоглобина (Hb) и уровня гематокрита (Ht) [2, 3]. Причины эритроцитоза разнообразны и могут быть в целом разделены на первичные (из-за внутреннего дефекта эритроидного ростка) или вторичные (внешним по отношению к клетке – эритроциту), которые в свою очередь делятся на врожденные и приобретённые. Согласно литературным данным семейные эритроцитозы можно так же разделить на четыре группы (ЕСУТ1-4). Первичный эритроцитоз (ЕСУТ1) связан с мутациями в рецепторе эритропоэтина (EPOR), которые вызывают длительную активацию рецептора, и характеризуется субнормальными уровнями эритропоэтина (ЕРО) в сыворотке. Вторичный эритроцитоз (ЕСУТ2-4), возникает в результате абберрантного контроля синтеза ЕРО из-за дефектов в кислородно чувствительном пути, который включает в себя путь созревания и дифференцировки эритроидного ростка, а также клеточный ответ в условиях гипоксии.

Наиболее распространенной причиной приобретенного первичного эритроцитоза является истинная полицитемия (ИП), которая относится к хроническим миелопролиферативным новообразованиям (ХМН). ХМН представляют собой гетерогенную группу заболеваний, характеризующуюся гиперпролиферацией миелоидных линий клеток, что позволяет предположить, что молекулярный дефект происходит из мультипотентной гемопоэтической стволовой клетки, а именно имеет клональный характер возникновения. В группу ХМН входят истинная полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), и миелофиброз (МФ) [4]. В развитии того или иного фенотипа ХМН участвуют соматические мутации в генах JAK2 в 14 и 12 экзонах (96% и 2% случаев при ИП соответственно), в гене MPL (3% при ЭТ и 8% при ПМФ) и гене CARL (20% при ЭТ и 25% при МФ). Нарушения пролиферации миелоидной линии клеток можно разделить на две основные группы в зависимости от того, имеют ли они пролиферацию в одной или нескольких линиях клеток. При нарушениях пролиферации одной линии обнаруживают поликлональный гематопоз с пролиферацией, ограниченной одной миелоидной линией, такой как эритроид (известный как семейный или наследственный эритроцитоз) или мегакариоцитарный (известный как семейный или наследственный тромбоцитоз), и возникают они из-за дефекта одного гена, наследуемого по менделевскому типу наследования.

Современная молекулярная диагностика онкогематологических заболеваний основана на выявлении конкретных генных мутаций, лежащих в основе того или иного вида заболеваний. Разнообразие генных патологий в организме человека существенно влияет на прогноз развития заболевания и исходы у пациентов [5].

Многие клинические состояния могут привести к приобретенному вторичному эритроцитозу. Известно, что гипоксия тканей ведет к производству EPO. Гипоксия тканей может развиваться из-за болезни легких или сердца. Эритроцитоз в данном случае не связан с миелопролиферацией, но ассоциирован с тяжелыми тромбоэмболическими или геморрагическими событиями, легочной артериальной гипертензией и редко опухолями [6,7].

Алгоритм молекулярно-генетического обследования пациентов с эритроцитозом позволит определить тип эритроцитоза, исключить или подтвердить наличие клонального заболевания, даст возможность врачу правильно поставить диагноз и подобрать необходимую терапию лечения. Ранняя диагностика эритроцитозов и отнесение их к определенному типу сможет предупредить осложнения, возникающие при данной группе заболеваний, а именно тромбозы, миелофиброз, злокачественную трансформацию и реже кровотечения.

Таким образом, цель данной работы – пересмотреть и дополнить алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозом.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать технологию с использованием гетеродуплексного анализа и с детекцией продуктов амплификации в вертикальном ПААГ. для скрининговой качественной оценки наличия соматических мутаций в гене CARL с целью выявления первичного приобретённого эритроцитоза или Истинной полицитемии.

2. Разработать технологии с использованием секвенирования по Сенгеру для анализа мутаций в генах EPOR, VHL, HIF2 α с целью определения типа и группы семейного эритроцитоза.

3. Пересмотреть алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозами с целью дифференциальной диагностики клональных и неклональных заболеваний.

4. Проанализировать ДНК пациентов с высокой клинико-гематологической вероятностью наличия одного из типов эритроцитозов с использованием предложенного алгоритма.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Регуляция эритропоэза

Совокупность взаимосвязанных физиологических процессов в организме человека отвечает за выработку и количество эритроцитов. Данные физиологические процессы поддерживают концентрацию гемоглобина на довольно стабильном уровне в течение всей жизни. Процесс эритропоэза начинается в костном мозге с образования линии плюрипотентных миелоидных клеток – предшественниц и дальнейшей дифференцировки этих клеток в незрелые эритроидные предшественники, которые сохраняют определенную пролиферативную способность. Впоследствии эти клетки – предшественницы подвергаются дальнейшей дифференцировке и созреванию. Все эти процессы регулируются транскрипционными факторами и эпигенетическими регуляторами [8].

Эритроидный фактор транскрипции (GATA-1) является регулятором дифференциации и выживаемости эритроидных предшественников. Так же GATA-1 запускает эритропоэз путем регуляции транскрипции нескольких генов, связанных с дифференцировкой эритроида, включая гены, участвующие в синтезе гема и / или глобина, гликофорины; гены, участвующие в регуляции клеточного цикла, и ген рецептора эритропоэтина (EPOR). Кроме того, регуляторами эритропоэза являются гормоны (гормоны щитовидной железы, андрогены, кортикостероиды), витамины (например, витамин B12 и фолиевая кислота), железо, регуляторы метаболизма железа (рецепторы трансферрина-1 и -2) и гематопоэтические факторы роста, такие как интерлейкин-3 [9].

Основным фактором регулирующим эритропоэз является гормон эритропоэтин (EPO), который секретируется в корковом веществе почек в интерстициальных клетках и перисинусоидных клетках печени. Производство EPO печенью преобладает в эмбриональной и пренатальный периоды, в то время как почечная секреция преобладает в течение зрелого возраста. Он активирует митоз и созревание эритроцитов из клеток – предшественников эритроидного ряда [10]. Продукцию EPO в клетках определяет клеточное парциальное давление кислорода в тканях (pO_2). В условиях гипоксии индукция экспрессии EPO главным образом определяет индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор (HIF), рисунок 1.

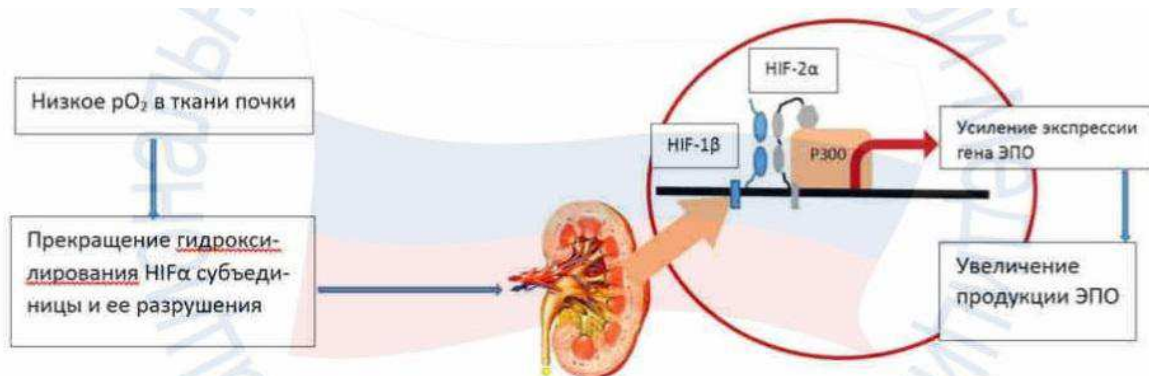


Рисунок 1. – Схема продукции ЕРО в почках при снижении рО₂ в тканях [11].

При снижении концентрации кислорода в крови на это реагируют интерстициальные клетки почек, ответственные за синтез ЕРО. В этих клетках происходит сложный молекулярный процесс, затрагивающий работу множества генов [11]. Основным регулятором этого процесса является индуцируемый гипоксией фактор 1/2 (HIF1/HIF2). Гетеродимерный белок HIF состоит из двух субъединиц: HIF- α и HIF β , рисунок 2.

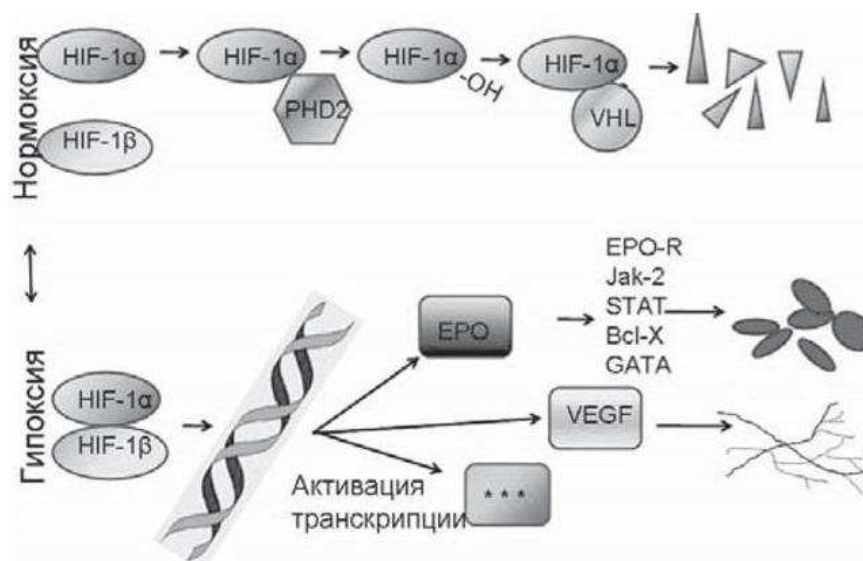


Рисунок 2. – Эритропоэз в условиях нормо- и гипоксии [12].

При нормальной концентрации кислорода происходит гидроксилирование аминокислотных остатков пролина свободной существующей молекулы HIF α в результате активности особого регуляторного фермента пролингидроксилазы 2 (PHD2), который является молекулярным сенсором кислорода. Измененная таким образом субъединица HIF α приобретает способность связываться с белком Гиппеля–Линдау (белок VHL–опухольный супрессор, с мутациями гена, кодирующего этот белок, связан наследственный синдром Гиппеля–Линдау, для которого характерны множественные гемангиомы, а также почечная карцинома, рак поджелудочной железы, ангиома сетчатки глаза). Белок VHL, в свою очередь, образует комплекс с рядом иных белков, относящихся к классу E3–убиквитин–лигаз. Активированные убиквитин–лигазы образуют

ковалентную связь с некоторыми другими белками, являясь для последних своеобразной «черной меткой», которая означает, что получивший такую метку «убиквитинизированный» белок вскоре должен быть направлен в протеосому и там подвергнут деградации. Таким образом, связывание белка VHL с гидроксированными пролинами HIF α приводит к убиквитинизации этого белка и последующей его протеосомной деградации.

В состоянии гипоксии белковая молекула HIF α не гидроксилируется и остается стабильной, избежав убиквитин–зависимого протеолиза. Субъединицы HIF α и HIF β объединяются, и образовавшийся в результате этого гетеродимерный белок HIF направляется из цитоплазмы в ядро, где связывается с особыми последовательностями ДНК в промоторных областях генов, экспрессия которых индуцируется гипоксией. В ответ на последовательность этих регуляторных событий интерстициальные клетки почек выделяют в кровеносное русло эритропоэтин, который в свою очередь активирует выработку и созревание эритроцитов [12].

1.2 Классификация эритроцитозов

В кровяном русле эритроциты составляют большинство клеток крови и тем самым могут влиять на ее вязкость. При повышении эритроцитов увеличивается вязкость крови, что свидетельствует о наличии патологии. Повышенные значения гемоглобина (Hb) или гематокрита (Ht) повышают вероятность эритроцитоза. Таким образом, эритроцитоз – это паталогическое состояние, при котором увеличивается количество эритроцитов, а также концентрации Hb и Ht выше контрольных значений [2, 13].

Первоначальная классификация эритроцитозов основана на том, является ли продукция эритроцитов первичным процессом, где костный мозг является источником продукции избыточного количества эритроцитов, или когда производство красных клеток крови связано с каким-то другим процессом, или когда этиология возникновения эритроцитоза не может быть установлена.

Эритроцитозы можно разделить на абсолютный и относительный. Абсолютный или истинный эритроцитоз возникает при увеличении массы эритроцитов до 125% от референсного значения (нормы), а также при повышении Hb и Ht [2]. Относительный эритроцитоз вызван резким уменьшением объема плазмы (например, из-за диуретиков или тяжелой диареи), в тоже время он отличается и от кажущегося эритроцитоза, вызванного артериальной гипоксией (например, курение сигарет, отравление угарным газом или апноэ во сне). Абсолютный эритроцитоз можно классифицировать как первичный или вторичный эритроцитоз, который может быть как врожденным, так и приобретенным рисунок 3 [2, 14].

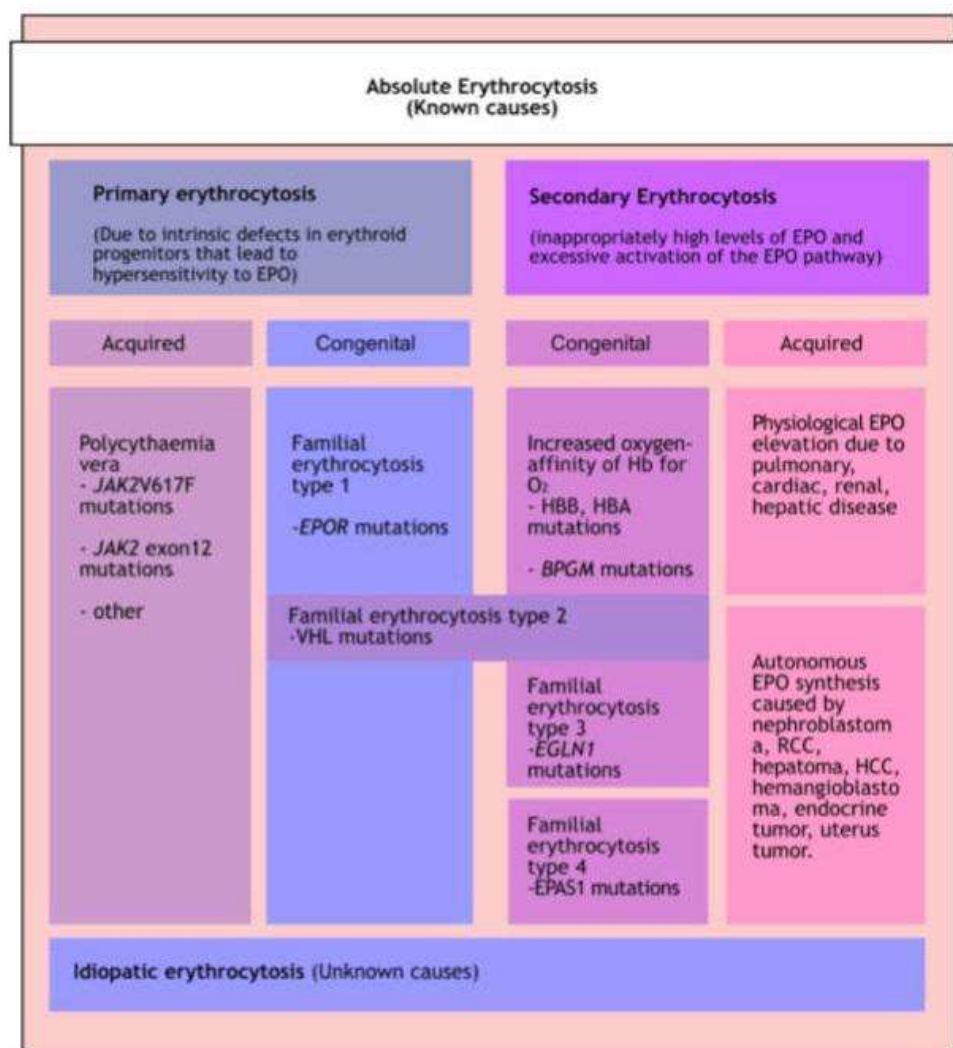


Рисунок. 3. – Классификация эритроцитозов [13].

Причинами первичного эритроцитоза являются мутации в клетках – предшественниках эритроидного ростка кроветворения. Первичный эритроцитоз обычно характеризуется низкими уровнями ЕРО в сыворотке крови. Приобретенный первичный эритроцитоз связан с ИП, который возникает из-за соматических мутаций в гене JAK2 в 12 и 14 экзонах, при которых происходит бесконтрольная активации сигнального пути ЕРО на уровне рецептора гена эритропоэтина (EPOR). Первичный врожденный эритроцитоз вызван мутациями в гене EPOR.

Вторичный эритроцитоз возникает при повышении уровня ЕРО вследствие мутаций в кислород-чувствительном пути, либо вследствие гипоксии, в результате паталогического состояния связанного с заболеванием сердца, почек, щитовидной железы и д.р. Причинами вторичного врожденного эритроцитоза могут быть мутации в кислород – чувствительном пути, включая мутации в гене VHL, PND2и HIF2 α [15, 16].

Согласно литературным данным семейные эритроцитозы можно так же разделить на четыре группы (ЕСУТ1-4). Первичный эритроцитоз (ЕСУТ1) связан с мутациями в рецепторе эритропоэтина (EPOR), которые вызывают длительную активацию рецептора, и характеризуется субнормальными

уровнями эритропоэтина (ЕРО) в сыворотке. Вторичный эритроцитоз (ЕСТУ2-4), возникает в результате бесконтрольного синтеза ЕРО из-за дефектов в кислород-чувствительном пути.

1.3 Хронические миелопролиферативные новообразования

Миелопролиферативные новообразования (МПН) представляют собой группу клональных заболеваний, возникающих на уровне гемопоэтических стволовых клеток, в результате мутаций, активирующих физиологические пути передачи сигналов, ответственных за гемопоэз. Точное происхождение МПН до сих пор неизвестно, но предполагается, что причиной данного заболевания является многоэтапность паталогического процесса, где предрасположенность к болезни в совокупности с влиянием внешних факторов на геном нормальной клетки приводит к злокачественной трансформации [4]. Молекулярно-генетические нарушения при МПН приводят к активации JAK-STAT сигнального пути, при котором увеличивается пролиферация миелоидного ростка кроветворения. В результате пролиферации увеличивается количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови человека.

К группе МПН относят: истинную полицитемию (ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ), миелофиброз (МФ) [17]. В основе патогенеза ИП, ЭТ, МФ лежат приобретенные соматические мутации в генах Янус киназы 2 (JAK2) в 12 и 14 экзонах, в гене рецептора тромбопоэтина (MPL) и в гене кальретикулина (CALR), которые наблюдаются приблизительно у 90% больных.

Так соматическая мутация в гене JAK2 в 14 и 12 экзонах встречается в 96% и 2% случаев при ИП соответственно. Мутация в 14 экзоне гена JAK2 также выявляется в 50% случаев при ЭТ и в 70% случаев при МФ. Тогда как мутация в 12 экзоне гена JAK2 практически не встречается при ЭТ и ПМФ. Мутации в гене MPL при МПН встречаются в 3% случаев при ЭТ и 8% при МФ. В то же время мутации в гене CALR обнаруживают в 20% случаев при ЭТ и 25% при МФ) [18].

ИП относится к группе МПН и приводит к пролиферации эритроидной линии клеток, увеличению числа эритроцитов, повышению уровня гемоглобина, тромбоцитозу и лейкоцитозу в периферической крови (панцитоз). Заболевание обычно протекает со спленомегалией, высоким риском кровотечений и тромбоэмболических осложнений. Для подтверждения диагноза ИП в соответствии с клиническими рекомендациями ВОЗ достаточно наличия высокого содержания гемоглобина и гематокрита, а также выявления какой-либо из клинически значимых соматических мутаций в гене JAK2, поскольку мутации в 14 и 12 экзонах JAK2 выявляются более чем в 95% случаев с ИП. В литературе активно обсуждаются случаи наличия мутаций в гене CALR у JAK негативных пациентов с клинической картиной ИП, ЭТ и эритроцитозом. Но в тоже время остается неясным клиническое значение мутации в гене CALR и ее вклад в развитие патогенеза ИП [19, 20].

Ген CALR кодирует кальций–связывающий белок, который локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и выполняет множество функций, связанных с шаперонной активностью и гомеостазом кальция. Мутации в гене CALR сосредоточены в экзоне 9 и состоят из различных комбинаций: делеций и вставок, которые приводят к сдвигу рамки считывания [21]. Сдвиг рамки считывания изменяет С–конец белка, который становится основным, в то время как в диком типе он кислый. На сегодняшний день было идентифицировано и классифицировано более 50 различных мутаций [22] в гене CALR, которые можно разделить на два типа. К первому типу относятся делеции, ко второму типу – вставки. Мутации типа 1 чаще встречаются при МФ, тогда как мутации типа 1 и типа 2 встречаются с одинаковой частотой при тромбоцитозе [23]. Мутации CALR происходят почти исключительно в ЭТ и МФ, но в литературе встречаются сообщения о случаях выявления мутаций в гене CALR в отсутствие мутаций в гене JAK2 на момент постановки диагноза у больных ИП, а также Идиопатическим эритроцитозом (ИЭ) [24]. Вследствие этого ставится вопрос о необходимости проведения анализа мутаций в гене CALR таким пациентам.

1.4 Первичный врожденный эритроцитоз первого типа (ЕСТУ1)

Первичный врожденный эритроцитоз или семейный эритроцитоз первого типа (ЕСТУ1) представляет собой патологию эритроидных предшественников, которые вследствие мутаций становятся гиперчувствительны к ЕРО. Данная патология имеет наследственный характер и передается по аутосомно–доминантному типу наследования. Характеризуется данное заболевание изолированным эритроцитозом вследствие наследования гиперчувствительного рецептора ЕРОR, наблюдается повышенная масса эритроцитов, связанная с субнормальными уровнями ЕРО в сыворотке, а так же нормальным размером селезенки. Вследствие этого ЕСТУ1 может имитировать клиническую картину ИП, но при нем гемопоз является поликлональным, и у пациентов с ЕСТУ1 не наблюдается какого-либо риска трансформации заболевания в МФ или лейкоз [25, 26].

Клинические проявления ЕСТУ1 связаны с эритроцитозом и могут включать синдром гипервязкости (головная боль, головокружение, усталость, зрительные и слуховые нарушения), а также артериальные и / или венозные тромбоэмболические события. Хотя большинство людей с ЕСТУ1 имеют только легкие проявления гипервязкости, а также головокружение или головную боль. В тоже время у некоторых пациентов были тяжелые, и даже смертельные осложнения, включая артериальную гипертензию, внутримозговое кровоизлияние, тромбоз глубоких вен, ишемическую болезнь сердца и инфаркт миокарда. Данных о распространенности ЕСТУ1 не указаны [27]. Но согласно работе 2016 года [28] было зарегистрировано 116 пострадавших из 24 семей.

Выживаемость, пролиферацию, а также дифференциацию эритроидных предшественников регулирует гормон ЕРО, который оказывает свое влияние на клетки–мишени, связываясь с внеклеточным N-терминальным доменом

рецептора EPOR. Гормон EPO присутствует в низких концентрациях в кровяном русле в условиях гомеостаза. При кислородном стрессе, таком как гипоксия или анемия, концентрация EPO в почках повышается, что приводит к значительному увеличению количества циркулирующих гормонов и выработке чрезмерного количества эритроцитов. EPO стимулирует образование эритроцитов путем связывания и активации рецептора эритропоэтина (EPOR), который обладает высоким к нему сродством, и экспрессируется преимущественно на поверхности незрелых эритроцитов [10, 11].

EPOR является членом суперсемейства рецепторов цитокинов типа I и представляет собой интегральный трансмембранный гликопротеин, состоящий из 508 аминокислот [29, 30]. Белок EPOR состоит из трех доменов: внеклеточного домена, служащего рецептором для сигнальной молекулы EPO, гидрофобного трансмембранного домена, который передает сигнал через клеточную мембрану и цитоплазматического домена, обеспечивающего активацию JAK2 белка и следовательно, фосфолирование остатков тирозина белка STAT5 или белков RAS/MAPK в JAK-STAT сигнальном пути передачи сигнала [31]. При стимулировании EPO, фосфорилирование внеклеточного домена EPOR приводит к конформационному изменению, при котором сигнал от EPO передается через трансмембранный домен и, тем самым, активирует нерецепторную цитоплазматическую тирозинкиназу JAK2, которая, в свою очередь, активирует путь JAK-STAT. Негативная регуляция EPOR осуществляется с помощью группы молекул-супрессоров, таких как тирозинфосфатаза (SH-1) и супрессор передачи сигналов цитокинов (SOCS), которые способствуют дефосфорилированию пути передачи сигнала и снижают стабильность рецептора рисунок 4. [32].

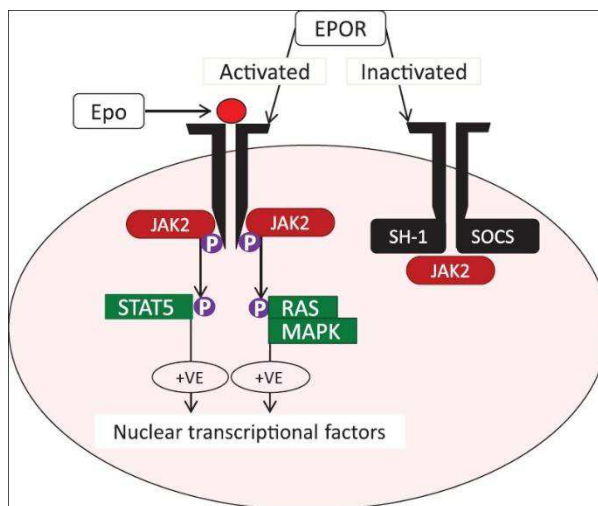


Рисунок. 4. – Рецептор эритропоэтина и JAK– STAT путь:

1. Активирование: сигнал от EPO активирует JAK2, осуществляющего фосфорилирование, вследствие которого активируются STAT5 и RAS-MAPK, посылающие сигналы ядерным транскрипционным факторам, способствующим пролиферации предшественников эритроцитов.

2. Инактивация: активирование тирозинфосфатазы (SHP-1) и супрессора цитокиновой сигнализации, способствующих дефосфорилированию JAK2 [13].

Контроль сигнального пути EPO–EPOR является важнейшим механизмом для осуществления нормального эритропоэза. Исследования на мышях доказали, что врожденный дефект сигнальной системы EPO–EPOR несовместим с жизнью, поскольку мыши с данным дефектом погибают от тяжелой анемии во время эмбрионального развития. В тоже время мутации, затрагивающие домены EPOR, вызывают неконтролируемый эритроцитоз и клинически связаны с эритроцитозом ECTY1 [33].

Мутации в гене EPOR сосредоточены в 8 экзоне на участке с.1142 – 1317 (176 bp), который кодирует C–концевой регуляторный домен белка, отвечающий за связь рецептора с супрессором передачи сигналов цитокинов (SHP-1 и SOCS). Большинство патологических вариантов мутаций в гене EPOR представляют собой нонсенс–мутации или мутации со сдвигом рамки считывания, связанные либо со вставками, либо с небольшими делециями. Они обнаружены в гетерозиготном состоянии и имеют аутосомно – доминантный тип наследования рисунок 5 [2, 34, 35]. Отсутствие цитоплазматических супрессоров EPOR приводит к избыточной экспрессии рецептора и, следовательно, к длительному фосфорилированию JAK2 с чрезмерной активацией пути передачи сигнала STAT5 и RAS–MAPK. Чрезмерная активация пути передачи сигнала способствует выживанию клеток, увеличивает пролиферацию и ускоряет дифференцировку предшественников эритроида, вызывая эритроцитоз ECTY1.

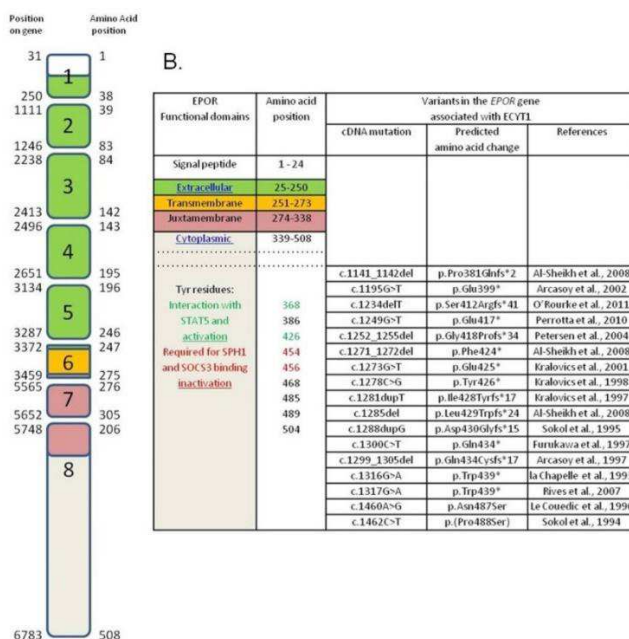


Рисунок.5. – Схематическое обозначение гена EPOR. Экзоны обозначены с 1 – 8, представлены в цвете [11].

Около 23 гетерозиготных патологических мутаций в гене EPOR были найдены у 116 пациентов [36]. Впервые мутации в гене EPOR были обнаружены у спортсмена и у 29 его родственников в Финляндии в 1993 году. Найденная мутация в гене EPOR была гетерозиготная нонсенс-мутация с. G6002A, приводящая к образованию стоп – кодон на Trp439. Данная мутация вызывает потерю С-терминального отрицательного регуляторного домена и усечение цитоплазматического домена EPOR. Также были описаны несколько миссенс мутаций у пациентов с неопределенной клинической значимостью. Chauveau et al [37] сообщили о точечной мутации (с. 1310G> A, р. Arg437His), которая была обнаружена у 52-летнего пациента с нормальной концентрацией Hb и нормальными показателями эритроцитов без какой-либо семейной истории [2]. Тем не менее, та же мутация была обнаружена и у 35-летнего пациента с ЕСТУ1, которому требовались частые флеботомии.

В целом пациенты с мутациями в гене EPOR имеют стабильное состояние, которое не прогрессирует в лейкоз, а также отсутствует спленомегалия. В тоже время сообщалось о тяжелых и даже смертельных случаях, таких как артериальная гипертензия, внутримозговое кровоизлияние, тромбоз глубоких вен, коронарная болезнь и инфаркт миокарда [2, 12, 34, 35].

1.5 Первичный приобретённый эритроцитоз или Истинная полицитемия

Причиной возникновения первичного приобретенного эритроцитоза является ИП, которая наряду с ЭТ и МФ относится к группе ХМН. ИП связано с увеличением эритроцитов и в некоторых случаях гранулоцитов и / или тромбоцитов, в тоже время рост гематокрита ИП увеличивает риск тромбоэмболических осложнений. Согласно литературным данным риск возникновения тромбоза повышается за счет мутаций в белке JAK2 в JAK-STAT сигнальном пути передачи сигнала. Кроме того, аномалии тромбоцитов могут привести к кровотечению и тромбозу [38]. Так же, у более чем половины пациентов с ИП наблюдается спленомегалия и часто выраженный аквагенный зуд (зуд, вызванный контактом с водой). Отечественные популяционные эпидемиологические данные о заболеваемости и распространенности отсутствуют. Согласно литературным данным частота распространенности ИП составляет приблизительно 1–1,9:100000 населения, медиана возраста в дебюте заболевания пациентов составляет примерно от 60 – 70 лет. При ИП существует риск перехода заболевания в Острый лейкоз (ОЛ) или МФ [39].

В 2005 году пять исследовательских групп, работающих независимо друг от друга, обнаружили мутацию JAK2V617F в экзоне 14 гена JAK2. JAK2 представляет собой цитоплазматическую тирозинкиназу, их функция заключается в том, что они служат промежуточным звеном между рецепторами на мембране клетки и сигнальными молекулами (цитокинами, факторами роста и пр.). Эти молекулы, связываясь с рецепторами JAK – киназ на поверхности клетки, активируют их, что приводит к активации сигнальных путей с участием

ряда белков, которые передают сигналы для транскрипции, пролиферации и дифференцировки бластных предшественников, участвующих в передаче сигналов различных цитокинов (в том числе от рецептора ЕРО). Мутация усиливает активность JAK2 и, таким образом, приводит к ЕРО-независимому росту рисунок 6. [40, 41].

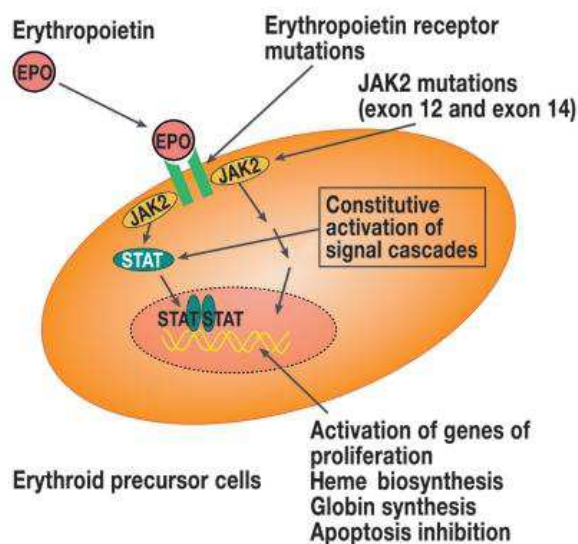


Рисунок. 6. – Схема JAK – STAT пути [6].

Мутация в гене JAK2 является соматической, так как не выявляется в зародышевой линии клеток. Кроме 14 экзона, мутация также встречается и в 12 экзоне гена JAK2. Пациенты с мутациями в 12 экзоне имеют более высокий уровень эритроцитов, но более низкий уровень лейкоцитов и тромбоцитов, чем пациенты с мутацией 14 экзоне [42].

1.6 Вторичный врожденный эритроцитоз второго типа (ЕСТУ2)

Причиной возникновения вторичного врожденного эритроцитоза или Чувашской полицитемии является мутации в гене Гиппеля–Линдау (VHL).

Белок VHL играет важнейшую роль в кислород-чувствительном пути. Ген VHL кодирует белок pVHL, который функционирует как часть комплекса VCB-CUL2, который нацелен на деградацию клеткой других белков, когда они становятся ненужными [43, 44]. Одной из мишеней комплекса VCB-CUL2 является белок HIF2 α , который является субъединицей более крупного белкового комплекса HIF, функцией которого является осуществление адаптации организма к изменяющимся уровням кислорода. HIF контролирует несколько генов, участвующих в делении клеток и продукции эритроцитов. HIF является основным фактором транскрипции, который определяет клеточный ответ в условиях гипоксии путем кислород-зависимого разрушения α субъединиц белка HIF. VHL входит в состав комплекса, отвечающего за узнавания субстрата комплекса убиквитин-протеин-лигаза, который в

условиях нормоксии осуществляет убиквитинирование HIF1 α и HIF2 α и направляет их на протеасомную деградацию в клетку [45]. При гипоксии или в результате мутации в гене VHL, накопление неразложившегося HIF1 α или HIF2 α приводит к образованию гетеродимера с HIF β и активации ряда генов, индуцируемых гипоксией, в том числе гены транспортера-1 глюкозы (SLC2A1), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), трансферрина (TF) и EPO рисунок 7. Белок VHL, согласно литературным данным, также регулирует работу других генов, участвует в контроле деления клеток. На основании этих функции белок VHL классифицируется как опухолевый супрессор, что означает, что он предотвращает рост и деление клеток слишком быстро или бесконтрольным образом [46 – 48].

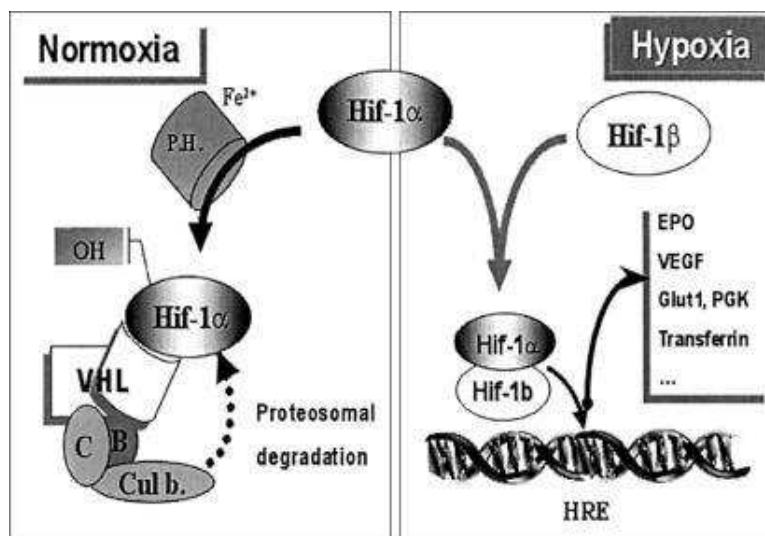


Рисунок 7. – Кислород – чувствительный путь [47].

Ген VHL расположен на коротком плече 3 хромосомы и состоит из 3 экзонов.

Первая мутация, связанная с потерей функции в гене VHL была ассоциирована с семейным вторичным эритроцитозом второго типа и найдена более чем у 100 человек из 80 семей, в Европейской части России, в Чувашской автономной республике. Обнаружено, что чувашская полицитемия вызвана мутацией в гене VHL (с.598C> T, р.Arg200Trp), которая появилась примерно от 14 000 до 50 000 лет назад. Позже мутация в гене VHL наблюдалась также и у пациентов с других регионов и стран с семейным эритроцитозом второго типа рисунок 8. [2].

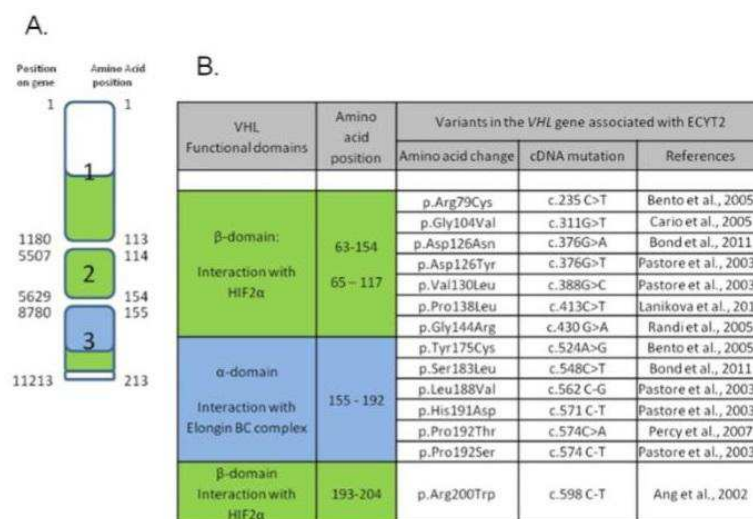


Рисунок 8. – Схематическое изображение гена VHL:
 А. – Экзоны (1 – 3) отмечены в цветных прямоугольниках;
 В. – Мутации в гене VHL [11].

Заболевание характеризуется высоким уровнем гемоглобина, повышенными значениями ЕРО в плазме, варикозным расширением вен, низким кровяным давлением, а также повышенными значениями сывороточной концентрации фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Чувашская полицитемия характеризуется ранней смертностью, главным образом в результате церебральных сосудистых событий или периферического тромбоза. Кроме того, клиническими особенностями данного заболевания является рубор и гемангиомы позвонков [49].

1.7 Вторичный врожденный эритроцитоз четвертого типа (ECTY4)

Индуклируемые гипоксией факторы (HIFs) являются центральным звеном в клеточном ответе в условиях гипоксии. HIF представляют собой αβ-гетеродимеры, состоящие из конститутивно экспрессируемой субъединицы HIF-β и кислород-зависимой субъединицы HIFα [50, 51]. HIF связывается с промоторами и энхансерами широкого спектра генов, участвующих в клеточных, локальных и системных реакциях на гипоксию. Они включают гены, которые облегчают поглощение глюкозы, усиливают гликолиз, ингибируют цикл Кребса, способствуют ангиогенезу и увеличивают выработку эритроцитов. Существует три изоформы HIFα (HIF1α, HIF2α и HIF3α), но только две из них (HIF1α, HIF2α) участвуют в регуляции уровня кислорода в тканях. Субъединица HIF1α была впервые идентифицирована как медиатор индукции ЕРО в ответ на гипоксию *in vitro*, кроме того в качестве основного транскрипционного фактора, индуцируемого экспрессию ЕРО, позднее был открыт HIF2α. Субъединица HIF3α отдаленно связанная изоформа, которая, согласно литературным данным играет антагонистическую роль в регуляции других изоформ HIF. Субъединицы HIFα включают домен кислород-зависимой деградации (ODD), придающий кислород-зависимую нестабильность, и два

независимых домена активации транскрипции (NTAD и C-TA) рисунок 9 [52, 53].

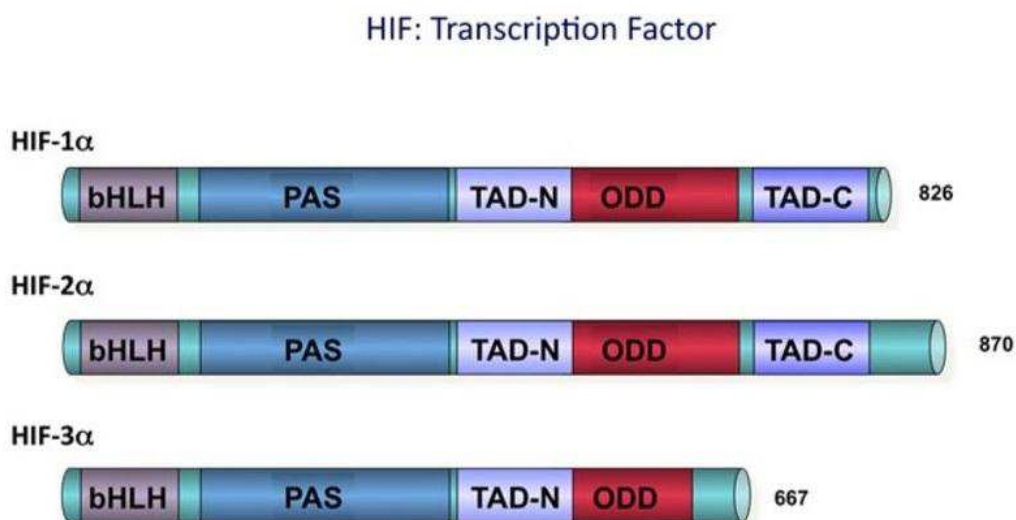


Рисунок 9. – Структура HIF субъединиц [52].

Гидроксилирование является основной посттрансляционной модификацией, регулирующей устойчивость кислород–зависимых субъединиц. У человека HIF- α –гидроксилирование катализируется тремя пролилгидроксилазами (PHD 1–3), аспарагинил–гидроксилазой и ингибирующей фактор HIF (FIH) (в совокупности они называются HIF-гидроксилазами)[53, 54]. HIF–гидроксилазы представляют собой диоксигеназы, которые используют 2–оксоглутатрат (2–OG) и субстраты кислорода, обеспечивают молекулярную основу для кислород–чувствительной функции этих ферментов. Белки PHD контролируют стабильность субъединиц HIF- α , а FIH регулирует активность транскрипции.

Участки, в которых осуществляется гидроксилирование PHD, и расположенные в ODD участки HIF α , позволяют связываться HIF α с белком VHL, являющимся компонентом распознавания мультикомплекса E3 убиквитинлигазы. При связывании VHL с HIF α изоформами происходит убиквитинирование изоформ и их дальнейшая деградация протеосомой. FIH гидроксилирует аспарагин в участки C-TAD в белке HIF α , что приводит к ингибированию связывания HIF α с белками ко-активатора транскрипции.

В условиях гипоксии гидроксилирование субъединиц HIF- α замедляется, что приводит к стабилизации HIF α . Затем HIF α транслоцируется в ядро, связывается с субъединицей HIF β и образует активный гетеродимер. При наборе подходящих коактиваторов, таких как p300 / CBP, HIF α/β гетеродимер связывается с элементами ответа на гипоксию в ДНК и активирует экспрессию HIF целевые генов. С помощью транскрипции HIF регулирует более 200 генов, среди которых гены, участвующие в пролиферации и выживании клеток, ангиогенезе, (фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста производных тромбоцитов (PDGF β)), регуляции поглощения и метаболизма глюкозы (переносчик глюкозы (Glut-1)), регуляции клеточного цикла (Cyclin D1) и эритропоэзе (через синтез EPO) [53 – 55].

Ген HIF2 α (EPAS1) расположен на второй хромосоме и состоит из 16 экзонов. Он кодирует транскрипционный фактор HIF2 α , состоящий из 870 аминокислот с молекулярной массой 96 кДа.

Впервые мутация в гене HIF2 α была обнаружена у членов семьи с эритроцитозом в трех поколениях. Все они были гетерозиготны по с.1660G> T (p.Gly537). Позднее было найдено еще 10 мутаций в 12 экзоне гена HIF2 α ассоциированных с эритроцитозом. У всех пациентов был диагностирован повышенный уровень EPO, повышенный риск легочной гипертензии и тромботических событий (легочная эмболия). Мутации в гене HIF2 α ассоциированы с молодым возрастом, повышенными значениями уровня EPO, а также тромботическими осложнениями [2].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования являлась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови пациентов с предварительным диагнозом эритроцитоз неясного генеза, поступивших на консультативный прием к врачам–гематологам в амбулаторно–поликлинические учреждения г. Красноярск и в Красноярскую краевую клиническую больницу. В исследование было включено 38 пациентов, среди которых было 32 (85%) мужчины и 6 (15%) женщин. Пациенты были отобраны за период 2012–2018 гг согласно следующим критериям:

- Повышенные значения гемоглобина ($> 120\text{--}140$ г/л);
- Повышенные значения гематокрита ($> 50\%$);
- Увеличенное количество эритроцитов, отличное от референсного значения ($> 5,5 \cdot 10^{12}$ клеток/л);
- Отсутствие соматических мутаций в 12 и 14 экзонах гена JAK2, ассоциированных с ХМН. Анализ данных мутаций был ранее проведен специалистами лаборатории молекулярно – генетический исследований СФУ и сотрудниками КНЦ Красноярского гематологического научного центра.

Взятие крови для молекулярно–генетических исследований осуществляли из локтевой вены утром натощак в вакутейнер с ЭДТА.

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили с использованием набора «ДНК–сорб–В» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»), а также с использованием набора реагентов GeneJET™ (ThermoFisherScientific). Концентрацию ДНК измеряли с использованием набора dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit («Invitrogen»).

Анализ на наличие мутаций в гене CALR с целью исключения диагноза ИП проводили с использованием разработанной ранее в лаборатории молекулярно – генетический методов исследований СФУ технологию гетеродуплексного анализа и с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза в вертикальном ПААГ [56].

Анализ на наличие мутаций в генах EPOR (8 экзон), VHL (2 и 3 экзона) HIF2 α (9 и 12 экзона) проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (ThermoFisherScientific, США).

2.2 Выделение ДНК из клинического материала с использованием реагента «ДНК-сорб-В» ИнтерЛабСервис

Выделение ДНК из цельной крови с использованием реагента «ДНК–сорб–В» («АмплиСенс») проводилось по следующей методике:

1. Достать из набора «ДНК–сорб–В» лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 и поставить на нагревающуюся поверхность термостата, на термостате выбрать «Режим 1» и температуру 65°C.

2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок типа Ерpendorf на 1,5 мл. Подписать пробирки (на крышке пробирки № пробы; на боковой поверхности: № пробы, фамилия пациента, дата выделения ДНК). Если необходимо, выделить отдельную пробирку для отрицательного контрольного образца (ОКО), на ней подписать «ОКО» и дату, отставить эту пробирку в сторону. В пробирки (во все, кроме «ОКО») добавить по 1 мл гемолетика (одним наконечником). Затем внести в пробирки с гемолетиком по 250 мкл исследуемой цельной крови (кровь предварительно перемешать пипетированием (если она находится в «эппендорфе») или переворачиванием 5-6 раз (если она находится в «вакутейнере»), закрыть крышку и перемешать на вортексе.

3. Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин, еще раз перемешать на вортексе и оставить еще на 5 мин.

4. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать, не задевая осадка, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов).

5. В пробирку «ОКО» добавить 100 мкл ОКО (из набора для секвенирования или др.).

6. Внести в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора (одним наконечником).

Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге.

Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

6. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

7. Добавить в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1 (одним наконечником), перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

8. Добавить в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2 (одним наконечником), перемешать на вортексе до полного ресуспендирования

сорбента универсального, центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

9. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 8, удалить надосадочную жидкость полностью.

10. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

11. В пробирки добавить по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

12. Центрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

2.3 Выделение ДНК с использованием набора «Gene JET Whole Blood Genomic DNA Purification», Thermo Fisher Scientific

ДНК выделяли с использованием набора «Gene JET Whole Blood Genomic DNA Purification» (Thermo Fisher Scientific).

Выделение ДНК осуществляли по следующей методике:

! Перед выделением необходимо прогреть Lysis Solution при 37°С для растворения солей. Затем охладить при комнатной температуре до 25 °С.

! Если используете новый набор для выделения ДНК, необходимо добавить по 30 мл этанола (96-100%) в Wash buffer WB 1 и Wash Buffer WB 2. Протеиназу К после первого использования необходимо хранить при температуре -20°С.

1. Добавить 20 мкл протеиназы К (Proteinase K) к 200 мкл крови, перемешать на вортексе. Добавить 400 мкл лизисного раствора (Lysis Solution) и тщательно перемешать путем вортексирования до получения однородной смеси. (Если использовать объем крови менее чем 200 мкл, необходимо довести объем образца до 200 мкл 1хPBS или ТЕ-буфером. Если использовать больший объем, необходимо следовать другому протоколу).

2. Инкубировать образец 10 минут при 56°С, иногда вортексируя, пока клетки полностью не будут лизированы.

3. Добавить 200 мкл этанола (96–100%) и перемешать пипетированием.

4. Перенести приготовленную смесь на колонку. Центрифугировать 1 минуту при 6000 g (8000 rpm). Выбросить пробирку, которая содержит проточный раствор. Поместить колонку в новую 2 мл пробирку.

5. Добавить 500 мкл Wash Buffer 1. Центрифугировать 1 минуту при 8000 g (10000 rpm). Вылить сточный раствор и поместить колонку обратно в пробирку.

6. Добавить в колонку 500 мкл Wash Buffer 2. Центрифугировать 3 минуты при максимальной скорости (≥ 20000 g, ≥ 14000 rpm). Рекомендация: слить проточный раствор, поместить колонку обратно в пробирку и центрифугировать колонку повторно 1 минуту при (≥ 20000 g, ≥ 14000 rpm).

Вылить сточный раствор из пробирки и поместить колонку в стерильную пробирку 1,5 мл для центрифугирования.

7. Добавить 200 мкл Elution Buffer к центру мембранной колонки для элюции геномной ДНК. Инкубировать 2 минуты при комнатной температуре и затем центрифугировать 1 минуту при 8000 g (10000 rpm).

* Для максимального выхода ДНК необходимо повторить пункт с добавлением 200 мкл буфера для элюции.

* Если требуется ДНК более высокой концентрации или если ДНК была выделена из небольшого количества исходного материала (например, 50 мкл), (например, 50 мкл), то объем буфера для элюции может быть уменьшен до 50-100 мкл. Имейте в виду, что меньшие объемы буфера для элюции могут привести к снижению конечного выхода элюированной ДНК.

8. Перенести элюированную ДНК в стерильные пробирки. Использовать очищенную ДНК сразу или хранить при температуре -20°C. Действие этого метода основано на том, что специфичный флуоресцентный краситель связывается только с молекулой-мишенью в данном случае с ДНК, и определяет точную концентрацию ДНК в образце.

2.4 Измерение концентрации ДНК на приборе Qubit (Invitrogen) с использованием набора реагентов Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit

Измерение концентрации ДНК с использованием набора реагентов Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit и флуориметра Qubit (Invitrogen) производилось согласно следующей методике:

Разморозить все реагенты при комнатной температуре.

1. Наставить пробирки на 0,5 мл в количестве (n), равном числу образцов ДНК плюс 2 стандарта. Подписать на крышечках номера образцов и стандартов.

2. Приготовить Рабочую смесь: 1×n мкл Реагента + 199×n мкл Буфера

3. Раскапать в пробирки:

а) для стандартов 190 мкл Рабочей смеси + 10 мкл Стандарта;

б) для исследуемых образцов: 199-180 мкл Рабочей смеси + 1-20 мкл ДНК

4. Вortexировать 2-3 сек, сбросить капли.

5. Инкубировать 2 мин.

6. Включить Qubit в сеть. Если прибор находится в спящем режиме, нажать любую кнопку для перехода в рабочий режим.

7. Выбрать вид анализа (dsDNA HS Assay), используя кнопки ↑ и ↓. Нажать GO.

8. Произвести калибровку:

а) Выбрать старую калибровку – Use last calibration. Нажать GO.

ИЛИ

б) Произвести калибровку заново:

- вставить Стандарт №1, нажать GO;

- вставить Стандарт №2, нажать GO.

9. Вставить исследуемую пробу, нажать GO. На экране появится число.

10. Рассчитать концентрацию ДНК в исходном образце: выбрать Calculate sample concentration используя кнопки ↑ и ↓, нажать GO.

11. Записать результат.

12. Убрать исследуемую пробу из прибора, вставить следующую и нажать GO.

2.5 Качественный анализ на наличие мутаций в 9 экзоне гена CALR

Для качественного анализа мутаций в 9 экзоне гена CALR использовали ранее предложенную технологию ПЦР с дополнительной стадией для образования гетеродуплексов [56] и с последующей детекцией продуктов амплификации методом электрофореза в вертикальном ПААГ. Данный этап в алгоритме исследования пациентов с эритроцитозом неясного генеза необходим с целью исключения диагноза ИП у пациентов.

2.5.1 Проведение ПЦР для анализа мутаций в 9 экзоне гена CALR

ПЦР проводили с использованием набора реагентов «Для проведения ПЦР–РВ в присутствии «EVA Green» (СИНТОЛ, Москва). Количество реагентов, вносимых в одну пробу представлено в таблице 1.

Таблица 1 – количество реагентов на одну пробу ПЦР

Реагенты		Количество на одну пробу, мкл
ddH ₂ O, деионизованная вода		14,3
10x ПЦР буфер Б + EVA Green		2,5
dNTP, дидезоксирибонуклеозидтрифосфат, 2,5мМ		2,5
MgCl ₂ , 25Мм		2,5
Праймеры, 10пмоль/мкл	Прямой	1
	Обратный	1
SynTaq ДНК-полимераза, 5Е/мкл		0,2
Образец ДНК		1

Праймеры для 9 экзона гена CALR были заимствованы из статьи [57]. Данные праймеры фланкируют участок длиной 265 пар оснований, они полностью охватывают 9 экзон гена CALR:

Forward: 5'-GGCAAGGCCCTGAGGTGT-3',

Reverse: 5'-GGCCTCAGTCCAGCCCTG-3'.

После приготовления общей смеси ее раскапывали по 24 мкл в каждую пробирку. Далее в пробирки вносили по 1мкл образцов ДНК. Пробирки центрифугировали на микроцентрифуге для сброса капель. Далее пробирки поместили в прибор для амплификации. Программа ПЦР с дополнительным этапом образования гетеродуплексов представлена в таблице 2. Амплификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США).

Таблица 2 – программа амплификации для CALRгена

Цикл	Повторы	Шаг	Время	Температура
1	1	1	3 мин	95°C
2	40	1	10 сек	95°C
		2	10 сек	57°C
		3	20 сек	72°C
3	1	1	1 мин	95°C
4	1	1	1 мин	42°C

Далее с продуктами амплификации проводили электрофорез в 8%-ом вертикальном ПААГ.

2.5.2 Электрофоретическая детекция продуктов амплификации

Электрофорез ДНК – это аналитический метод для разделения фрагментов ДНК по размеру (длине) и форме (в случае, если ДНК образует вторичные структуры, например шпильки). При проведении электрофореза молекула ДНК, которая является отрицательно заряженной молекулой, мигрирует в геле под воздействием сил электрического поля. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют в геле медленнее, так как задерживаются в нем, а более короткие молекулы двигаются быстрее. К образцам обычно добавляют низкомолекулярный кислый краситель (например, динитрофенол, бромфеноловый синий) для визуализации процесса электрофореза. Кроме того, краситель также необходим для того, чтобы определить, когда стоит остановить процесс проведения электрофореза. Электрофорез проводится в камере, заполненной буферным раствором. Чаще всего используются буферы, содержащие ЭДТА, трис и борную кислоту: ТАЕ и ТВЕ. Буфер необходим для повышения ионной силы раствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК под действием сил электрического поля. После разделения фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, агарозные гели обычно красят бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах. Определение размеров производят путем сравнения коммерчески доступных фрагментов ДНК (DNA ladder, «линейка») – линейные фрагменты ДНК известной длины. Для электрофоретического анализа ДНК обычно используют агарозные (для относительно длинных молекул ДНК) и полиакриламидные (для высокого разрешения коротких молекул ДНК, например, в случае секвенирования) гели.

В нашей работе мы используем электрофорез в вертикальном ПААГ. С продуктами амплификации проводится электрофорез в 8%-ном вертикальном ПААГ (соотношение акриламид: бисакриламид = 29:1) в 0,5xТВЕ-буфере.

Детекция результатов проводится путем окрашивания ПААГ бромистым этидием в течение 5-7 минут с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете с использованием системы гель–документирования GelDoc (Bio-Rad, США). Соответствие молекулярных весов амплификатов оценивали с помощью маркера молекулярного веса GeneRuler™ Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific™, США), размер фрагментов от 700 до 265 п.о.).

Таблица 3 – Приготовление 8% ПААГ геля объемом 65 мл

Реагент	Объем, мл	Общий объем, мл	Примечание
ddH ₂ O	44,420	65	Одним наконечником.
10xТБЕ	3,250		Одним наконечником. Становиться 0,5xТБЕ.
ПААГ(30%)	17,330		Одним наконечником. Становится 8%.
10% ПСА	0,650		Полимеризатор.
Тимед	0,065		Катализатор.

2.6 Анализ на наличие мутаций в генах кислород – чувствительного пути на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США)

Для выявления мутаций в генах EPOR (8 экзон), VHL(2 и 3 экзоны) HIF2 α (9 и 12 экзоны) проводили секвенирование по Сенгеру на приборе AB3500 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.6.1 Проведение первой ПЦР для анализа мутаций в 8 экзоне гена EPOR

ПЦР проводили с использованием набора реагентов DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific™, США). Участки конца седьмого и восьмого экзонов гена EPOR амплифицировали, используя 1 пару праймеров:

EPOR_F (5`–CAGAGAGCGAGTTTGAAGGC–3`),
EPOR_R (5–GCCATCCCTGTTCCATAAGTC).

Праймеры были подобраны самостоятельно с использованием программы Vector NTI Software (Thermo Fisher Scientific), Количество реагентов, вносимых в одну пробу представлено в таблице 4.

Таблица 4 – количество реагентов на одну пробу ПЦР

Реагенты	Количество на одну пробу, мкл
DreamTaqPCRMasterMix (2X)	12,5
Water, nuclease-free	7,5
Праймеры, 10пмоль/мкл	Прямой 1

	Обратный	1
Образец ДНК		3

После приготовления общей смеси ее раскапывали по 22 мкл в каждую пробирку. Далее в пробирки вносили по 3мкл образцов ДНК. Пробирки центрифугировали на микроцентрифуге для сброса капель. Далее пробирки поместили в прибор для амплификации. Амплификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Программа амплификации представлена в таблице 5.

Таблица 5. – программа амплификации для 8 экзона EPOR гена

Цикл	Повторы	Шаг	Время	Температура
1	1	1	3 мин	95°C
2	35	1 2 3	10 сек 30 сек 1 мин	95°C 60°C 72°C
3	1	1	15 мин	72°C

2.6.2 Проведение первой ПЦР для анализа мутаций во 2 и 3 экзонах гена VHL

Для проведения первой ПЦР для амплификации 2 экзона гена VHL использовали 1 пару праймеров:

F_GAGGTTTCACCACGTTAGCC;

R_AGCCCAAAGTGCTTTTGAGA.

Праймеры фланкируют участок длиной 486 пар оснований и полностью охватывают 2 экзон гена VHL.

Кроме того, для проведения первой ПЦР были также использованы праймеры полностью охватывающие 3 экзон гена VHL, в котором встречается самая распространенная мутация ответственная за развития чувашской полицитемии с.598C> T(p.Arg200Trp).

F_CAGAGGCATGAACACCATGA

R_AAGGAAGGAACCCAGTCCTGT

Праймеры для 3 экзона гена VHL фланкируют участок длиной 462 пар оснований. Обе пары праймеров были заимствованы из статьи [2].

При проведении ПЦР для 2 и 3 экзонов гена VHL использовали комплект реагентов для «ПЦР – РВ в присутствии EVAGreen» (СИНТОЛ, Москва). Количество реагентов, вносимых в одну пробу представлено в таблице 6.

Таблица 6 – количество реагентов на одну пробу ПЦР

Реагенты	Количество на одну пробу, мкл
1	2
ddH ₂ O, деионизованная вода	13,25
1	2

10x ПЦР буфер Б + EVAGreen		2,5
dNTP, дидоксинуклеозидтрифосфат, 2,5мМ		2,5
MgCl ₂ , 25мМ		1,5
Праймеры, 10пмоль/мкл	Прямой	1
	Обратный	1
SynTaqДНК-полимераза, 5Е/мкл		0,25
Образец ДНК		3

После приготовления общей смеси ее раскапывали по 22 мкл в каждую пробирку. Далее в пробирки вносили по 3мкл образцов ДНК. Пробирки центрифугировали на микроцентрифуге для сброса капель. Далее пробирки поместили в прибор для амплификации. Амплификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Программа амплификации представлена в таблице 7.

Таблица 7. – Программа амплификации для 2 и 3 экзонов гена VHL

Цикл	Повторы	Шаг	Время	Температура
1	1	1	3 мин	95°C
2	35	1	10 сек	95°C
		2	30 сек	61°C
		3	30сек	72°C
3	1	1	3 мин	72°C

2.6.3Проведение первой ПЦР для анализа мутаций в 9 и 12 экзонах гена HIF2 α .

Для проведения первой ПЦР в 9 и 12 экзонах гена HIF2 α использовали по одной паре праймеров полностью охватывающих экзон 9 и 12.

Праймеры на 9 экзон гена HIF2 α :
 F_CCATGCATCTAGGGGAGCAGA
 R_AACTCTTCCCAGCCCCAACG

Праймеры на 12 экзон гена HIF2 α :
 F_TCTGCAGGAGCTGAGTTG
 R_CTTACTAGTGGGTGCCTCT

Праймеры для 9 экзона гена HIF2 α фланкируют участок длиной 343 пар оснований, а праймеры для 12 экзона участок длиной 631 пары оснований. Обе пары праймеров были заимствованы из статьи [2].

При проведении реакции ПЦР для амплификации 9 экзона гена HIF2 α использовали комплект реагентов для «ПЦР – РВ в присутствии EVAGreen» (СИНТОЛ, Москва). Количество реагентов, вносимых в одну пробу представлено в таблице 8.

Таблица 8 – количество реагентов на одну пробу ПЦР для амплификации участка 9 экзона гена HIF2 α

Реагенты		Количество на одну пробу, мкл
ddH ₂ O, деионизованная вода		13,25
10x ПЦР буфер Б + EVAGreen		2,5
dNTP, дидеоксирибонуклеотидтрифосфат, 2,5мМ		2,5
MgCl ₂ , 25мМ		1,5
Праймеры, 10пмоль/мкл	Прямой	1
	Обратный	1
SynTaqДНК-полимераза, 5Е/мкл		0,25
Образец ДНК		3

После приготовления общей смеси ее раскапывали по 22 мкл в каждую пробирку. Далее в пробирки вносили по 3мкл образцов ДНК. Пробирки центрифугировали на микроцентрифуге для сброса капель. Далее пробирки поместили в прибор для амплификации. Программа ПЦР с дополнительным этапом образования гетеродуплексов представлена в таблице 9. Амплификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США).

Таблица 9. – программа амплификации для 9 экзона гена HIF2 α

Цикл	Повторы	Шаг	Время	Температура
1	1	1	3 мин	95°C
2	35	1	10 сек	95°C
		2	30 сек	64°C
		3	30сек	72°C
3	1	1	3 мин	72°C

При проведении реакции ПЦР для амплификации 12 экзона гена HIF2 α использовали комплект реагентов DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific™, США). Количество реагентов, вносимых в одну пробу представлено в таблице 8.

Таблица 10 – количество реагентов на одну пробу ПЦР для амплификации участка 12 экзона гена HIF2 α

Реагенты		Количество на одну пробу, мкл
DreamTaqPCRMasterMix (2X)		12,5
Water, nuclease-free		7,5
Праймеры, 10пмоль/мкл	Прямой	1
	Обратный	1
Образец ДНК		3

После приготовления общей смеси ее раскапывали по 22 мкл в каждую пробирку. Далее в пробирки вносили по 3мкл образцов ДНК. Пробирки центрифугировали на микроцентрифуге для сброса капель. Далее пробирки поместили в прибор для амплификации. Программа ПЦР с дополнительным этапом образования гетеродуплексов представлена в таблице 10. Амплификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США).

Таблица 11. – программа амплификации для 12 экзона гена HIF2 α

Цикл	Повторы	Шаг	Время	Температура
1	1	1	3 мин	95°C
2	35	1	10 сек	95°C
		2	30 сек	60°C
		3	1 мин	72°C
3	1	1	15 мин	72°C

2.6.4 Чистка продукта ПЦР с использованием реагента ExoSAP-IT.

Реагент ExoSAP-IT предназначен для простой и быстрой очистки продукта ПЦР для последующих применений, таких как секвенирование ДНК или анализа нуклеотидных полиморфизмов (SNP). Когда ПЦР-амплификация завершена, ExoSAP-IT удаляет любые неиспользованные dNTP и праймеры, оставшиеся в смеси продуктов ПЦР. Пример работы реагента ExoSAP-IT представлен на рисунке 10.

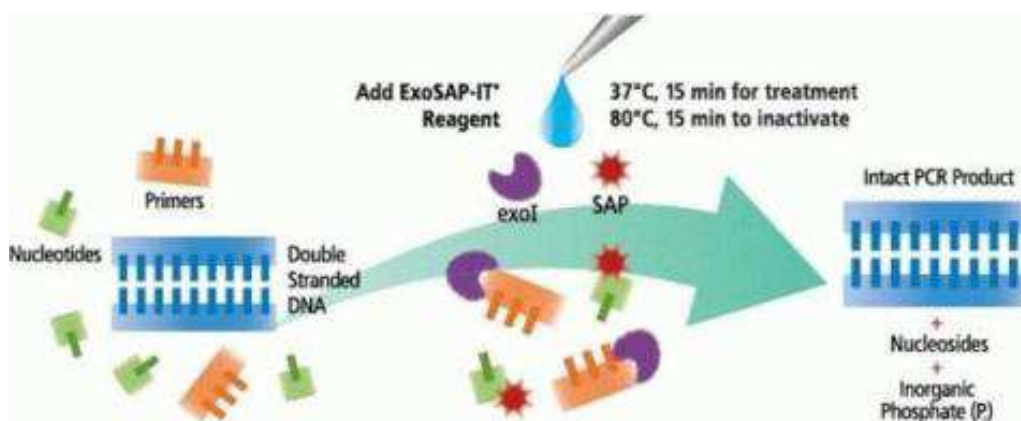


Рисунок 10. – Пример работы реагента ExoSAP-IT.

ExoSAP-IT добавляют непосредственно к продукту ПЦР и инкубируют при 37°C в течение 15 минут. После обработки ПЦР-продуктов ExoSAP-IT инактивируется просто путем нагревания до 80°C в течение 15 минут. ExoSAP-IT содержит два гидролитических фермента: экзонуклеазу I и щелочную фосфатазу (SAP) вместе с буфером для удаления dNTP и праймеров из продукта ПЦР. Экзонуклеаза I удаляет одноцепочечные праймеры, содержащиеся в ПЦР-продукте. SAP удаляет несвязавшиеся dNTP из смеси ПЦР.

Протокол очистки ПЦР – продукта реагентом ExoSAP-IT.

Замечание: Храните реагент ExoSAP-IT при температуре –20°C в морозильной камере.

1. Достаньте реагент ExoSAP-IT из морозильной камеры и продолжите работать с ним на льду в течение всей процедуры.

2. Смешайте 5 мкл ПЦР – продукта с 2 мкл ExoSAP-IT – реагента. При работе с ПЦР – продуктом более 5 мкл просто пропорционально увеличивайте количество реагента ExoSAP-IT.

3. Инкубируйте при 37°C в течение 15 минут, чтобы удалить оставшиеся праймеры и нуклеотиды.

4. Инкубируйте при 80°C в течение 15 минут, чтобы инактивировать ExoSAP-IT реагент.

5. ПЦР – продукт теперь готов к использованию. Обработанные ПЦР – продукты могут храниться при –20°C до тех пор, пока они не потребуются.

2.6.5 Проведение секвенирующей ПЦР

Секвенирующую ПЦР с прямого и обратного праймеров проводили с использованием BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Подготовка реакционной смеси для секвенирующей реакции представлена в таблице 11.

Таблица 12 – Подготовка реакционной смеси для секвенирующей реакции (из расчета на 1 тест).

Компоненты реакционной смеси	Количество, вносимое в пробирку (мкл)
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	8
Forward primer or reverse primer	2

Количество вносимого ПЦР-продукта в реакционную смесь составило 5-20 нг. Далее реакционная смесь доводилась H₂O до 20 мкл.

2.6.6. Очистка сиквенс – продукта с использованием набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США).

Очистку сиквенс-продукта проводили с использованием набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США). Данный набор содержит 2 реагента: XTerminator™ Solution (удаляет концевые красители и свободные соли в секвенирующей реакции), SAM™ Solution (повышает производительность реагента XTerminator™ Solution и стабилизирует реакции после очистки).

При работе с ПЦР – продуктом после реакции секвенирования менее 20 мкл просто пропорционально уменьшайте количество реагента XTerminator™ Solution и SAM™ Solution.

Процесс очистки сиквенс-продукта:

1. В каждую пробирку, содержащую сиквенс-продукт, добавить 90 мкл реагента SAM™ Solution.

2. Перемешать реагент XTerminator™Solution и внести по 20 мкл в пробирку.

3. Далее в течение 30 минут вортексировать, после чего продукт перенести в плашку и отцентрифугировать.

Пробы подвергали капиллярному электрофорезу на генетическом анализаторе 3500 (AppliedBiosystems, США).

2.6.7. Проведение очистки ПЦР – продукта после секвенирующей реакции изопропиловым спиртом

Приготовление спирта:

75 мл изопропилового спирта + 25 мл dH₂O

Процесс очистки сиквенс-продукта:

1. 5 мкл ПЦР – продукта после секвенирующей реакции + 80 мкл изопропилового спирта (75%), плавно перемешать. 2. Перемешать реагент XTerminator™Solution и внести по 20 мкл в пробирку.

2. Затем на 20 минут поставить на шейкер или оставить на столе и перемешивать. Пробы подвергали капиллярному электрофорезу на генетическом анализаторе 3500 (AppliedBiosystems, США)

3. Затем поставить пробирки в центрифугу с закрытыми крышками на 30 минут 10°C на 3,5 тыс.об./мин.

4. После центрифугирования ДНК абсорбируется на дне пробирки. Аккуратно отобрать спирт, наклонив пробирку на 45°.

5. Добавить по 50 мкл изопропанола (2 – ая отмывка) и сразу в центрифугу на 10 мину, 10°C на 3,5 тыс./об

6. После центрифугирования аккуратно отобрать спирт, наклонив пробирку на 45°.

7. Затем в термоциклер (Veriti) по программе с открытыми крышками: 63°C – 3 мин, 25°C – бесконеч.

8. Можно убрать в темноту в штатив до сиквенса (не добавлять на этом этапе формамид). Формамид добавлять непосредственно перед сиквенсом 10 мкл.

9. Далее в термоциклер (Veriti): 95°C – 5 мин., 4°C – 10 мин., 4°C – бесконеч.

10. Затем переносим из пробирок в плашку и запускаем прибор.

2.6.7. Специализированные программы для обработки полученных результатов

SeqScanner Software – программное обеспечение (ПО), позволяющее просматривать результаты секвенирования (секвенограммы) как с прямого, так и с обратного праймера. Также с помощью данной программы можно визуально увидеть мутацию, но обозначение мутации данная программа определять не может.

SeqScape Software – ПО, предназначенное для обнаружения и анализа мутаций, обнаружения и проверки SNP и подтверждения последовательности. Безусловно, плюсом данного ПО является то, что оно может определять тип и обозначение мутаций.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Критерии отбора пациентов для анализа герминальных мутаций, ассоциированных с семейным эритроцитозом в генах кислород-чувствительного пути: EPOR, HIF2 α , VHL

Работа по выявлению мутаций, ответственных за клональное развитие заболевания, а именно ИП ведется с 2012 года сотрудниками лаборатории молекулярно – генетических методов исследований СФУ и сотрудниками КНЦ Красноярского гематологического научного центра. Как уже отмечалось ранее, для постановки диагноза ИП и выявления клонального характера заболевания необходим молекулярно – генетический анализ на наличие мутаций в гене JAK2 в 12 и 14 экзонах, рисунок 11. Но примерно в 20% случаях пациенты с эритроцитозами остаются без четко установленного диагноза и имеют неопределенный диагноз «эритроцитоз неясной этиологии». Для таких пациентов необходимо проводить молекулярно – генетическое тестирование на наличие мутаций в генах кислород – чувствительного пути, который связан с созреванием, дифференцировкой и клеточным ответом в условиях гипоксии, анализ в генах EPOR, HIF2 α , VHL.

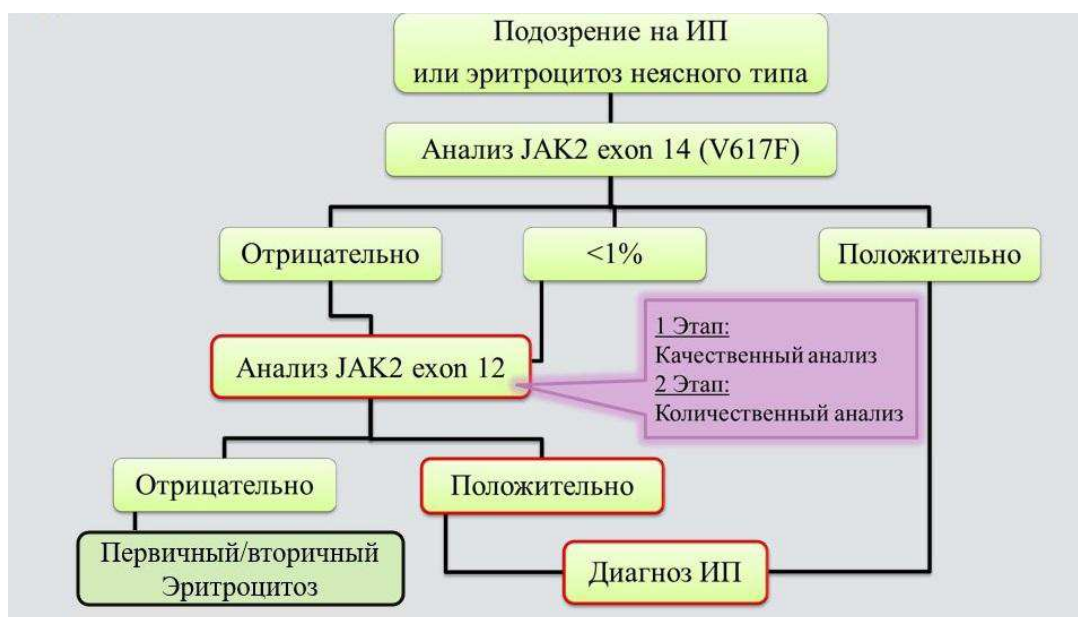


Рисунок 11 – Диагностический алгоритм ИП

Таким образом, в исследование по критериям, в которые входили повышенные значения гемоглобина и гематокрита, повышенные значения количества эритроцитов, а также отсутствие соматических мутаций в 14 и 12 экзонах гена JAK2, было отобрано 38 пациентов с предварительным диагнозом эритроцитоз неясной этиологии.

В тоже время важно отметить, что в последнее время в литературе встречаются данные о редких случаях выявления мутаций в гене CALR у пациентов с первичным приобретённым эритроцитозом или истинной

Изъято 13 страниц

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы:

1. Разработана технология с использованием гетеродуплексного анализа и с детекцией продуктов амплификации в вертикальном ПААГ для скрининговой качественной оценки наличия соматических мутаций в гене *CARL* с целью выявления первичного приобретённого эритроцитоза или Истинной полицитемии.
2. Разработана технология с использованием секвенирования по Сенгеру для анализа мутаций в генах *EPOR*, *VHL*, *HIF2 α* с целью определения типа и группы семейного эритроцитоза.
3. Пересмотрен и дополнен алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозами с целью дифференциальной диагностики клональных и неклональных заболеваний.
4. Использование разработанного алгоритма позволило уточнить диагноз для 8 из 38 пациентов: один из пациентов имеет диагноз истинной полицитемии – рака крови), а 7 пациентов имеют различные типы семейных эритроцитозов, в частности два человека с семейным эритроцитозом первого типа (ЕСТУ1), два человека с семейным эритроцитозом второго типа (ЕСТУ2), и три человека с семейным эритроцитозом четвертого типа (ЕСТУ4).

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ХМН – хронические миелопролиферативные новообразования
ИП – истинная полицитемия
ЭТ – эссенциальная тромбоцитемия
МФ – миелофиброз
ПЦР – полимеразная цепная реакция
CALR - ген кальретикулина кальций связывающего белка
JAK – янус-киназа
EPO – эритропоэтин
EPOR – рецептор эритропоэтина
Hb – гемоглобин
Ht – гематокрит
ECTY1 – семейный эритроцитоз первого типа
ECTY2 – семейный эритроцитоз второго типа
ECTY3 – семейный эритроцитоз третьего типа
ECTY4 – семейный эритроцитоз четвертого типа
VHL – ген Гиппеля—Линдау
HIF – индуцируемый гипоксией фактор
GATA1 – эритроидный фактор транскрипции
pO₂ – парциальное давление
PHD – пролингидроксилаза
ИЭ – идиопатический эритроцитоз
SOCS – супрессор передачи сигналов цитокинов
SHP-1 – тирозинфосфатаза
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
SLC2A1 – ген транспортера-1 глюкозы
TF – трансферрин
PDGFβ – фактор роста производных тромбоцитов
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
ADP – аденозиндифосфат
ATP – аденозинтрифосфат
dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат
EDTA – этилендиаминтетраацетат
STAT – сигнал трансдукции и активации транскрипции
Ph – филадельфийская хромосома
ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
ОЛ – острый лейкоз
ОКО – отрицательный контрольный образец
ПААГ – полиакриламидныйгель
ТАЕ буфер – трис-ацетатный буфер
ТВЕ буфер – трис-боратный электродный буфер
УФ – ультрафиолет

ПО – программное обеспечение
Glut-1 – переносчик глюкозы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бархатов, И. М. Секвенирование нового поколения и области его применения в онкогематологии / И. М. Бархатов, А. В. Предеус, А. Б. Чухловин // Онкогематология. – 2016. – Т. 11. – С. 56 – 863
2. Percy, M. J. Genetic origins and clinical phenotype of familial and acquired erythrocytosis and thrombocytosis/ M. J. Percy, E. Rumi // American Journal of Hematology. – 2009. – Vol. 84, № 1. — P. 46 – 54.
3. Celeste, B. Congenital Erythrocytosis and Hereditary Thrombocytosis / B. Celeste, C. Holger, G. Betty // European Cooperation in Science and Technology. – 2015. – P. – 207.
4. Меликян, А. Л. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph – негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) / А. Л. Меликян, А. Г. Туркина, К. М. Абдулкадыров // Клинические рекомендации. – 2014. – 2014. С. 12 – 15.
5. Percy, M. J. Erythrocytosis due to a mutation in the erythropoietin receptor gene / M. J. Percy, M. F. McMullin, A. W. W. Roques, N. B. Westwood et al. // British Journal of Haematology. — 1998. — Vol. 100. — P. 407–410.
6. Percy, M. J. Congenital Erythrocytosis and Hereditary Thrombocytosis / M. J. Percy, B. Celeste, C. Holger, G. Betty // European Cooperation in Science and Technology. – 2015. – P. – 207.
7. McMullin, M. F. Idiopathic erythrocytosis: a disappearing entity/ M. F. McMullin // Hematology. – 2009. – V. 1. – P. 629–635.
8. Valent, P. Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts / P. Valent, G. Büsche, I. Theurl, I. Z. Uras et al. // Haematologica. – 2018. – V. 103, № 10. – P. 1593 – 1603.
9. Wolfgang, J. Regulation of erythropoietin production / J. Wolfgang // The Journal of Physiology. – 2011. – V. 589. – P. 1251–1258.
10. Volker, H. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism / H. Volker // American Journal of Physiology. – 2010. – V. 299. – P. 1 – 13.
11. Мисюрин, А. В. Молекулярный патогенез миелопролиферативных заболеваний / А. В. Мисюрин // Онкогематология. – 2009. – Т. 2. – С. 211 – 219.
12. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1751-553X.2008.01102.x>
13. McMullin, M.F. The classification and diagnosis of erythrocytosis / MF. McMullin // International journal of laboratory hematology. – 2008. – V. 30. – P 447-459.
14. Passamonti, F. Polycythemia vera in young patients: a study on the long-term risk of thrombosis, myelofibrosis and leukemia / F. Passamonti, L. Malabarba, E. Orlandi, C. Barateet et al. // Blood. — 2013. — Vol. 88. — P. 13–18.
15. Rawlings, J. S. The JAK/STAT signaling pathway / J. S. Jason, M. R. Kristin, A. H. Douglas // Journal of Cell Science. – 2004. – P. 1281–1283.

16. Меликян, А.Л. Биология миелопролиферативных новообразований / А.Л. Меликян, И.Н. Суборцева // Клиническая онкогематология. – 2016. – Т. 9, № 3. – С. 314-325
17. Tefferi, A. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms / A. Tefferi, J. Thiele, A. M. Vannucchi, T. Barbui et al. // *Leukemia*. – 2014. Vol. 28. – P. 1407–1413.
18. Luo, W. Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs) / W. Luo, Z. Yu // *Stem Cell Invest.* – 2015. Vol. 2. – P.16.
19. Nangalia, J. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2 / J. Nangalia, C. E. Massie, E. J. Baxter, G. Nice et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2013. Vol.369. – P. 2391–2405.
20. Chauveau, A. Absence of CALR mutations in JAK2-negative polycythemia / A. Chauveau, O. Nibourel, S. Tondeur, D. L. Paz et al. // *Haematologica*. –2017. Vol. 102, № 1. – P.15–16.
21. Klampfl, T. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms / T. Klampfl, H. Gisslinger, A. S. Harutyunyan // *N. Engl. J. Med.* – 2013. Vol.369 – P. 2379–2390.
22. Catalog of somatic mutations in cancer [Internet]. Available from: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>
23. Spivak, J. L. Myeloproliferative neoplasms / J. L. Spivak // *N. Engl. J. Med.* – 2017. Vol. 376 – P.2168–2181.
24. Broseus, J. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera / J. Broseus, J. H. Park, S. Carillo, S. Hermouet et al. // *Blood*. – 2014. Vol.124, № 26. – P. 3964–3966.
25. Pasquier, F. New pathogenic mechanisms induced by germline erythropoietin receptor mutations in primary erythrocytosis / F. Pasquier, M. Caroline, T. Balligand, F. Verdier et al. // *Haematologica*. – 2018. Vol.103, №4. – P. 575–586.
26. Bento, S. Primary Familial and Congenital Polycythemia / S. Bento, M. F. McMullin, M. Percy, H. Cario et al. // *GeneReviews* [Internet].
27. Aljabry, M. S. Primary familial and congenital polycythemia; The forgotten entity / M. S. Aljabry // *J Appl Hematol.* – 2018. Vol.9, №2. – P. 39–44.
28. Percy, M. J. Genetic origins and clinical phenotype of familial and acquired erythrocytosis and thrombocytosis / M. J. Percy, E. Rumi // *American Journal of Hematology*. – 2008. – V. 84. – P. 46 – 54.
29. Percy, M J. Erythrocytosis due to a mutation in the erythropoietin receptor gene / M. J. Percy, M.F. McMullin, A. Roques // *British Journal of Haematology*. – 1998. – V. 100. – P. 407–410.
30. Patnaik, M. M. The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired / M. M. Patnaik, A. Tefferi // *Leukemia*. – 2009. – V. 23. – P. 834–844.
31. Pasquier, F. New pathogenic mechanisms induced by germline erythropoietin receptor mutations in primary erythrocytosis / F. Pasquier, C. Marty, T. Balligand, F. Verdier et al. // *Haematologica*. – 2018. Vol. 103, №4. – P. 575–586.
32. Arcasoy, M. O. Familial erythrocytosis associated with a short deletion in the erythropoietin receptor gene / M. O. Arcasoy, B. A. Degar, K. W. Harris, B. G. Forget // *Blood*. – 1997. Vol. 89, №12. – P. 4628–35.

33. Rives, S. Molecular genetic analyses in familial and sporadic congenital primary erythrocytosis / S. Rives, H. L. Pahl, L. Florensa, B. Bellosillo et al. // *Haematologica*. – 2007. Vol. 92, №5. – P. 674–677
34. Percy, M. J. Genetic origins and clinical phenotype of familial and acquired erythrocytosis and thrombocytosis / M. J. Percy, E. Rumi // *American Journal of Hematology*. – 2008. – V. 84. – P. 46–54.
35. Patnaik, M. M. The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired / M. M. Patnaik, A. Tefferi // *Leukemia*. – 2009. – V. 23. – P. 834–844.
36. Percy, M. J. Erythrocytosis due to a mutation in the erythropoietin receptor gene / M. J. Percy, M. F. McMullin, A. W. Roques, N. B. Westwood et al. // *Br J Haematol*. – 1998. Vol.100. – P. 407–410
37. Chauveau, A. A new point mutation in EPOR inducing a short deletion in congenital erythrocytosis / A. Chauveau, P. D. Luque, L. Lecucq, G. G. Le. et al. // *Br J Haematol*. – 2016. Vol. 172. – P. 475–477.
38. Siegel, F. P. Congenital and Acquired Polycythemia / F. P. Siegel, P. E. Petrides // *Dtsch Arztebl Int*. – 2008. Vol. 105, №4. – P. 62–68.
39. Passamonti, F. Polycythemia vera in young patients: a study on the long-term risk of thrombosis, myelofibrosis and leukemia / F. Passamonti, L. Malabarba, E. Orlandi et al. // *Blood*. — 2013. — Vol. 88. — P. 13–18.
40. Rawlings, J. S. The JAK/STAT signaling pathway / J. S. Rawlings, K. M. Rosler, D. A. Harrison // *Journal of Cell Science* – 2004. –P. 1281-1283.
41. Bench, A. J. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations / A. J. Bench, H. E. White, L. Foroni // *British Journal of Haematology*. – 2013. – Vol. 160. – P. 25 – 34.
42. Tamotsu, I. JAK2 V617F-Dependent Upregulation of PU.1 Expression in the Peripheral Blood of Myeloproliferative Neoplasm Patients / I. Tamotsu, U. Munehiro, Y. Humitsugu // *PLoS One*. – 2011. – Vol.7. – P.148.
43. Perrotta, S. Von Hippel-Lindau-dependent polycythemia is endemic on the island of Ischia: identification of a novel cluster / S. Perrotta, B. Nobili, M. Ferraro, C. Migliaccio et al. // *Blood*. – 2006. – Vol. 107, №2. – P. 514 – 519.
44. Cario, H. Mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and VHL-haplotype analysis in patients with presumable congenital erythrocytosis / H. Cario, K. Schwarz, N. Jorch, U. Kyank et al. // *Haematologica*. – 2005. – Vol. 90, №1. – P. 19 – 24.
45. U. S. National library of medicine [Internet]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/VHL>
46. Percy, M. J. Familial erythrocytosis: molecular links to red blood cell control / M. J. Percy, F. S. Lee // *Haematologica*. – 2008. – Vol. 93, №7. – P. 963 – 967.
47. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. Available from: <https://www.omim.org/entry/263400>
48. Tomasic, N. L. The phenotype of polycythemia due to Croatian homozygous VHL (571C>G:H191D) mutation is different from that of Chuvash polycythemia (VHL 598C>T:R200W) / N. L. Tomasic, L. Piterkova, C. Huff, E. Bilic // *Haematologica*. – 2013. – Vol.98, №3. – P. 560 – 567.

49. Pastore, Y. Mutations of von Hippel-Lindau Tumor-Suppressor Gene and Congenital Polycythemia / Y. Pastore, K. Jedlickova, Y. Guan, E. Liu et al. // *Am J Hum Genet.* – 2003. – Vol. 73, №2. – P. 412 – 419.
50. Percy, M. J. Familial erythrocytosis: molecular links to red blood cell control / M. J. Percy, F. S. Lee // *Haematologica.* – 2008. – Vol. 93, №7. – P. 963 – 967.
51. Percy, M. J. A Gain-of-Function Mutation in the HIF2A Gene in Familial Erythrocytosis / M. J. Percy, P. W. Furlow, G. S. Lucas, R. C. Path., X. Li et al. // *N Engl J Med.* – 2008. – Vol. 358, №2. – P. 162–168.
52. Perrotta, S. Congenital erythrocytosis associated with gain-of-function HIF2A gene mutations and erythropoietin levels in the normal range / S. Perrotta, D. P. Stiehl, F. Punzo, S. Scianguetta et al. // *Haematologica.* – 2013. – Vol.98, №10. – P. 1624–1632.
53. Yong, S. Novel HIF2A mutations disrupt oxygen sensing, leading to polycythemia, paragangliomas, and somatostatinomas / S. Yong, M. G. Sun, J. Matro, T. T. Huynh et al. // *Blood.* – 2013. – Vol. 121. – P. 2563–2566.
54. Lorenzo, F. R. A Novel EPAS1/HIF2A germline mutation in a Congenital Polycythemia with Paraganglioma / F. R. Lorenzo, C. Yang, M. N. Tang Fui, H. Vankayalapati et al. // *J Mol Med (Berl).* – 2013. – Vol. 91, №4. – P. 507–512.
55. Furlow, P. W. Erythrocytosis-associated HIF-2 α Mutations Demonstrate a Critical Role for Residues C-terminal to the Hydroxylacceptor / P. W. Furlow, M. J. Percy, S. Sutherland, C. Bierl // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2009. – Vol. 284. – P. 9050–9058.
56. Ватутин, Н. Т. Алгоритм обследования больного с эритроцитозом / Н. Т. Ватутин, Г. Г. Тарадин, Е. В. Склянная, Л. И. Кардашевская и др. // *Электронный сборник материалов ежегодной научно-практической конференции «Актуальные вопросы терапии: на стыке специальностей».* – 2017. – С. 177 – 184.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра защиты и современных технологий мониторинга лесов

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой



И. Е. Ямских

подпись

« 25 » июня 2019 г.

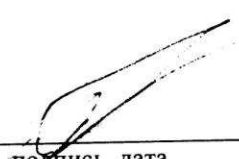
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозом

06.04.01 Биология

06.04.01.06 Геномика и биоинформатика

Научный руководитель


подпись, дата

к. б. н. Т.Н. Субботина

Выпускник


подпись, дата

А.А. Карнюшка

Рецензент


подпись, дата

профессор, д-р мед. наук
Ю.И. Гринштейн

Красноярск 2019