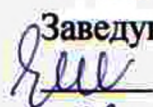


Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Шишацкая Е.И.
« 23 » июня 2016г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Выявление хромосомных aberrаций и эпигенетических мутаций у детей при
острых лейкозах

Руководители



к. б. н. Субботина Т.Н.

Выпускник



Карнюшка А.А.

Красноярск 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	7
1. Обзор литературы.....	7
1.1 Классификация лейкозов	7
1.2 Генетическая основа развития Острых Лейкозов	9
1.3 Транслокация t (12;21) (p13;q22), TEL – AML1	10
1.4 Транслокация t(8;21)(q22;q22), AML1 – ЕТО	12
1.5 Транслокация t(1;19) (q23; p13) E2A (TCF3)	13
1.6 Минимальная остаточная болезнь (МОБ)	14
1.7 Экспрессия гена WT1 для определения МОБ	16
1.8 JAK2-STAT Сигнальный путь	18
2. Материалы и методы	21
2.1 Объект исследования	21
2.2 Выделение лейкоцитов из костного мозга	21
2.3 Выделения РНК из лейкоцитов костного мозга с помощью комплекта реагентов «РИБО-золь-D»(ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»).....	22
2.4 Измерение концентрации РНК	23
2.5 Проведение Обратной транскрипции	25
2.6 Проведение первого этапа ПЦР	26
2.7 Проведение второго этапа ПЦР	29
2.8 Проведение гибридизации на биологическом микрочипе «ЛК-БИОЧИП»	30
2.9 Определение уровня экспрессии WT1 и JAK с использованием метода ПЦР – РВ	32
2.10 Статистическая обработка полученных результатов	36
3. Результаты и обсуждения.....	Ошибка! Закладка не определена.

3.1 Оценка распространенности определенных химерных транскриптов в Красноярском крае по сравнению с литературными данными	37
3.2 Уровень экспрессии WT1 и JAK2 у детей с ОЛЛ и ОМЛ	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	43
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	45

ВВЕДЕНИЕ

К числу распространенных онкологических заболеваний относятся лейкозы, которые занимают ведущее место в структуре онкологических заболеваний среди детей в возрасте до 15 лет и составляют 30 – 35% всех злокачественных опухолей [1].

Лейкоз – это клональное злокачественное (неопластическое) заболевание кроветворной системы, к которому относится обширная группа заболеваний, различных по своей этиологии, и характеризующихся повышенным содержанием морфологически незрелых – бластных – клеток крови, которые с одной стороны, не выполняют нормальные функции зрелых клеток, а с другой – за счет активной пролиферации вытесняют нормальные клетки-предшественники. Характерной особенностью лейкозов является быстрое распространение опухолевых клеток крови по кровеносному руслу во внутренние органы и селезенку. В норме в костном мозге располагаются стволовые клетки крови, которые обладают способностью к дифференцировке и выполнению специализированных функций в организме. Из этих стволовых клеток развиваются все разновидности форменных элементов крови. При лейкозах, кровяные клетки способны размножаться на более поздних стадиях гемопоэза, чем в норме. Опухолевые клетки начинают неумолимо размножаться и замещают нормальные клетки костного мозга и крови [2].

Весь комплекс кроветворения можно разделить на два направления (ростка): лимфопоэз (образование лимфоцитов) и миелопоэз (образование остальных типов клеток крови). В зависимости от того какой росток кроветворения поражен, лейкозы делятся на лимфоидные (лимфобластные) и миелоидные (миелобластные). По клиническому течению лейкозы делятся на: острые и хронические [3].

Заболеваемость острыми лейкозами детей в России стабильна и составляет $3,17 \pm 0,39$, показатель смертности от них составляет $1,67 \pm 0,28$

случая на 100 тыс. Так на острый лимфобластный лейкоз приходится 80% случаев заболевания, прежде всего среди детей в возрасте 1 – 4 лет, на острый миелоидный лейкоз – 17% случаев [4].

Острые лейкозы по своей природе являются клональным заболеванием, то есть возникают из одной мутировавшей кроветворной клетки, которая может относиться как к уже дифференцированным (коммитированным) в сторону различных линий кроветворения клеткам – предшественницам, так и к очень ранним клеткам. Развитие Острых Лейкозов ассоциировано с хромосомными абберациями. Хромосомные абберации характерны для опухолевых клеток: они обнаружены во всех основных типах злокачественных опухолей. На сегодняшний день насчитывается 57709 видов хромосомных аббераций [2]. С развитием острых лейкозов связана такая хромосомная абберация, как транслокация, при которой происходит перенос участка хромосомы на негомологичную хромосому, что в результате приводит к образованию химерного транскрипта и продуцированию химерного белка. Наличие определенных химерных транскриптов, образующихся в результате хромосомных аббераций, могут быть использованы в качестве оценки эффективности терапии и прогнозирования гематологического рецидива.

Одним из важных методов, помогающих оценивать уменьшение уровня опухолевых клеток в костном мозге, является МОБ [5], под которым понимают популяцию опухолевых клеток, оставшуюся в организме после достижения клинко – гематологической ремиссии (когда количество бластных клеток в миелограмме менее 5% т.е. количество клеток не распознаваемых стандартными цитологическими методами) [5, 6]. Мониторинг МОБ одновременно может служить нескольким целям: оценке эффективности терапии, сравнению различных лечебных протоколов, контролю за сохранением ремиссии и максимально раннему обнаружению рецидивов для своевременной коррекции тактики лечения. Количественная диагностика МОБ важна практически на всех стадиях лечения ОЛ. Для определения МОБ при ОЛ в последние годы стали применять экспрессию гена WT1, занимающего важное

место в гемопоэзе, которое связано с регуляцией пролиферацией и дифференцировкой клеток [7].

В норме многие гены не экспрессируются, а степень экспрессии имеет высокую индивидуальную вариабельность. Экспрессия гена JAK2 приводит к образованию белка JAK2, участвующего в пролиферации и дифференцировки бластных клеток – предшественниц [8]. В литературе описаны случаи повышения экспрессии не мутантного (дикого типа) JAK2 у взрослых с ОМЛ. У детей с ОМЛ и ОЛЛ оценка экспрессии JAK2 не проводилась [9].

Исходя из вышесказанного, целью данной работы явилось выявление химерных транскриптов и определение уровня экспрессии генов WT1 и JAK2 у детей с диагнозом острым лейкозом.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Проанализировать хромосомные транслокации в лейкоцитах аспирата костного мозга пациентов – детей с диагнозом Острый лейкоз.
2. Оценить уровень экспрессии генов WT1 и JAK2 в лейкоцитах аспирата костного мозга пациентов – детей с ОМЛ по сравнению с ОЛЛ.
3. Провести анализ зависимости уровня экспрессии от наличия исследуемых транслокаций.

Работа выполнялась в Красноярском филиале ФГБУ Гематологического научного центра Минздрава России и КГБУЗ Красноярского краевого клинического центра охраны материнства и детства.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Обзор литературы

1.1 Классификация лейкозов

Лейкозы подразделяют на несколько типов по следующим признакам:

- По течению (скорости развития и прогрессирования симптомов):

1. Острый лейкоз

Острые лейкозы представляют собой гетерогенную группу злокачественных заболеваний системы крови с характерным поражением костного мозга бластными – незрелыми клетками [3]. Термин «острый лейкоз» отражает не временной фактор (длительность течения болезни), а морфологические и цитохимические особенности опухолевых клеток. Характерной чертой данного типа лейкоза является развитие из недифференцированных или малодифференцированных клеток, а также быстрое прогрессирование, при котором количество паталогических клеток нарастает довольно быстро [10]. При исследованиях костного мозга обнаруживают высокое содержание бластных клеток, по сравнению с нормальными – зрелыми клетками крови, выполняющими специализированные функции в организме. Кроме того, при ОЛ наблюдается «лейкемический провал» – отсутствие промежуточных форм между бластами и зрелыми клетками [11]. В дальнейшем (или с самого начала) может происходить инфильтрация бластными клетками различных тканей и органов. ОЛ регистрируют у лиц любого возраста, но при этом отмечают два пика заболеваемости – в возрасте 3 – 4 и 60 – 69 лет, мужчины болеют чаще, чем женщины. В прошлом (до середины 1960-х годов) ОЛ в течение нескольких месяцев приводил к смерти больных, в связи с чем и был предложен термин «острый лейкоз» [12]. В настоящее время достигнуты значительные успехи в его лечении: в большинстве случаев (20-40%) удается достигнуть полной ремиссии, которая может продолжаться более пяти лет у 10-20% больных острыми нелимфобластными лейкозами и у 50% пациентов с острыми

лимфобластными лейкозами. Пациенты с ОЛ постоянно чувствуют усталость, более подвержены развитию различных инфекций с тяжелым течением, селезенка у них приобретает большие размеры, снижается артериальное давление и учащается пульс, легко появляются синяки и кровоизлияния. Течение острых лейкозов имеет агрессивный характер и без лечения они очень быстро приводят к летальному исходу (в течение недель или месяцев) [10, 11].

2. Хронический лейкоз

Хронические лейкозы представляют собой группу злокачественных заболеваний системы крови, для которых характерен дефект (мутация) на уровне полипотентной стволовой клетки [3]. Развиваются из практически зрелых или зрелых клеток, количество патологических клеток нарастает небыстро, кроме того, они частично или даже полностью выполняют специализированные функции. В крови обычно выявляются незрелые, но с тенденцией к созреванию клетки, которые постепенно и медленно прогрессируют, при этом больные при отсутствии лечения могут прожить несколько лет [10]. Пациенты с хронической лейкемией могут долгое время не предъявлять никаких жалоб, и первой причиной для беспокойства часто становится обычный анализ крови, в котором случайно может обнаружиться высокий уровень патологических клеток [12]. Без лечения в конечном итоге в костном мозге произойдет замещение нормальных клеток патологическими с развитием соответствующих клинических симптомов. При хроническом лейкозе больные могут жить без лечения несколько месяцев и лет [11, 12].

➤ По источнику (пораженному ростку кроветворения):

1. Миелоидный (миелобластный, миелоцитарный) лейкоз.

Поражается миелоидный росток кроветворения. При этом происходит нарушения в процессе образования гранулоцитов (белых кровяных телец) и их функционирования.

2. Лимфоидный (лимфобластный, лимфоцитарный).

Поражается лимфоидный росток кроветворения. При этом разрастание лимфоидной ткани происходит в костном мозге, в лимфоузлах, в печени, в

селезенке, а также в других видах органов [10].

1.2 Генетическая основа развития Острых Лейкозов

В генетической основе развития острых лейкозов (ОЛ) лежат структурные изменения в структуре хромосом (хромосомные aberrации). В большинстве случаев при ОЛ встречается такой вид хромосомной aberrации, как транслокация, при которой происходит перенос участка хромосомы на негомологичную хромосому [13]. Транслокации приводят к образованию слитого (химерного) гена – транскрипта. Экспрессия химерных транскриптов приводит к появлению химерных продуктов: химерной мРНК и химерного белка, которые, с одной стороны, обладают измененными свойствами по сравнению с продуктами исходных генов, а с другой стороны, могут служить маркерами злокачественных клеток [14]. Наличие определенных химерных транскриптов, экспрессирующих химерные продукты (РНК и белки) могут служить как диагностическими маркерами, так и терапевтическими мишенями., а также могут быть использованы в качестве оценки эффективности терапии и прогнозирования гематологического рецидива [7].

В зависимости от того какие транслокации произошли, можно правильно поставить диагноз, определить ход течения заболевания, его характер и скорректировать лечение. Например, некоторые изменения кариотипа наблюдаются как при ОЛЛ, так и при других лимфоидных опухолях, другие – исключительно при ОЛЛ. Так для ОЛЛ, но не для других лимфопролиферативных заболеваний, характерны транслокации $t(9;22)(q34;q11)$, $t(4;11)(q21;q23)$, $t(1;19)(q23;p13)$. Стоит отметить, что при транслокации $t(9;22)(q34;q11)$, осуществляется взаимодействие между 9 и 22 хромосомой. В хромосоме 22 в гене BCR есть два основных участка разрыва: M-bcr (major)–между 12 и 16 экзонами и m-bcr (minor)–в первом интроне. На 9 хромосоме в гене ABL есть только один участок разрыва: в первом интроне. Транслокация по M-bcr приводит к синтезу химерного белка BCR-ABL – p210, характерного для хронического миелоидного лейкоза, а транслокация по m-bcr

– к появлению химерного белка BCR–ABL – p190, который специфичен для ОЛЛ [14, 15].

Частота конкретной хромосомной аномалии сильно зависит от возраста пациентов. Например, у больных ОЛЛ с возрастом увеличивается доля t (9;22) (3% у детей и 25% у взрослых) и уменьшается доля t (12;21) (22% у детей и 2% у взрослых). У детей до 1 года, больных ОМЛ, мажорными являются транслокации 11-ой хромосомы (более 30% всех случаев ОМЛ), наиболее частая из которых t (4;11), в то время как во всех других возрастных группах эти транслокации встречаются в 1–3% случаев ОМЛ. У детей до 1 года практически не встречается транслокация t (8;21), зато она наиболее частая в возрасте 1–19 лет: на ее долю приходится 18% случаев ОМЛ в этой возрастной группе [14].

1.3 Транслокация t (12;21) (p13;q22), TEL – AML1

Транслокация t (12;21) (p13;q22) встречается примерно в 25% случаев при В – клеточном лейкозе, в то время при Т-клеточном лейкозе она встречается довольно редко, возраст детей составляет от 2 до 9 лет. На молекулярном уровне результатом данной транслокации является образование химерного транскрипта из генов TEL (12p13) и AML (21q22). В гене TEL место разрыва находится между пятым и шестым экзоном, в гене AML1 – между вторым и третьим. В результате транслокации гены «сшиваются» на месте разрыва [14].

Ген AML1 (RUNX1) находится на 21 хромосоме и относится к семейству белков RUNX, к которому также относят транскрипционные факторы RUNX2 и RUNX3 (они же AML2 и 3 соответственно). Транскрипционные факторы RUNX принимают участие в регуляции таких важнейших процессов в организме млекопитающих, как гемопоэз (RUNX1), остеогенез (RUNX2), нейрогенез, тимопоэз и регуляция пролиферации клеток эпителия желудка (RUNX3). Каждый из белков RUNX кодируется только одним геном, но в результате альтернативного сплайсинга образуются его различные изоформы: RUNX1a, RUNX1b, RUNX1c и RUNX1N. На работу фактора RUNX1 большое

влияние оказывают белки, вовлеченные в регуляцию клеточного цикла. RUNX1 содержит три сайта, фосфорилируемых циклин – зависимыми киназами. На сегодняшний день известно большое число генов, в регуляции экспрессии которых, принимает участие белок RUNX1. В промоторной области всех этих генов находится сайт связывания RUNX1. Обычно именно этот сайт определяет тканевую специфичность экспрессии того или иного гена. RUNX1 активен в лимфоидных, миелоидных и эритроидных клетках. Он контролирует экспрессию генов цитокинов, клеточных рецепторов, регуляторов клеточного цикла. В В – лимфоцитах RUNX1 активирует экспрессию генов, кодирующих IgA1 и тирозинкиназу BLK, стимулирует транскрипцию генов, кодирующих α -, β -, γ -, δ -цепи Т-клеточных рецепторов, IL-3, гранзим В, CD3 и цитокин MIP-1 α , в Т-лимфоцитах. RUNX1 экспрессируется только в клетках кроветворной системы. На сегодняшний день известны многочисленные повреждения гена RUNX1 [16]. Описано более 30 хромосомных транслокаций, затрагивающих ген RUNX1, некоторые хромосомные перестройки могут приводить к развитию различных лейкозов. Среди хромосомных перестроек с участием гена RUNX1 лучше всего изучены транслокации t (8;21) и t (3;21).

Ген TEL находится на 12 хромосоме и относится к семейству факторов транскрипции ETS. Белки – ETS контролируют экспрессию генов, которые влияют на ряд биологических процессов, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку, трансформацию и апоптоз. Кроме того они участвуют и в белок – белковых взаимодействиях. Хромосомные перестройки с участием TEL приводят к различным миелоидным и лимфоидным лейкозам и к возникновению солидных опухолей. Продукты перестроек можно разделить на две группы: транскрипционные факторы и тиразинкиназы. TEL представляет собой ингибитор увеличения числа злокачественных клеток [14, 16].

В результате транслокации образуется химерный транскрипт – TEL – AML1, который продуцирует химерный белок. Биологические функции химерного гена и его продукта в лейкозе остаются неизвестными. Транслокация t (12;21) является практически неуловимой при

цитогенетическом исследовании. Определить ее наличие можно с использованием FISH и ПЦР. Данная аномалия имеет весьма благоприятное прогностическое значение: доля полных ремиссий приближается к 100%, подавляющее большинство больных переживает 5 лет [14].

1. 4 Транслокация t (8;21) (q22;q22), AML1 – ETO

Транслокация t (8;21) (q22;p22) выявляют в среднем в 18% случаев у детей с ОМЛ. При данной транслокации область гена ETO (Eight–Twenty–One), находящегося на длинном плече 8-й хромосомы, переносится на ген AML1 (Acute Myeloid Leukemia) с длинного плеча 21-й хромосомы, в результате чего образуется химерный ген, который кодирует слитный белок AML1 – ETO [3, 17].

Ген AML (ныне RUNX1) кодирует ДНК–связывающую альфа-субъединицу транскрипционного комплекса CBF транскрипционный регуляторный фактор CBF. Консервативный Runt-домен (RHD – Runt Homology Domain), локализованный на N–конце белка AML1, необходим для связывания с ДНК и кофактором CBFβ. C–конец белка AML1 содержит трансактивационные и репрессорные домены [3]. Гетеродимерный комплекс AML1–CBFβ связывается с ДНК в определенном сайте. Белок CBFβ усиливает связывание AML1 с ДНК, а также стабилизирует AML1, защищая его от убиквитин–зависимого протеолиза. CBF регулирует транскрипцию многих генов, необходимых для дифференцировки клеток миелоидного и лимфоидного ряда, путем связывания с другими факторами транскрипции [18].

Все представители семейства ETO (Eight–Twenty–One), также как и AML, участвуют в активации транскрипции и являются «скаффолдинг»–белками, характерной чертой которых является наличие четырех эволюционно консервативных доменов NHR 1–4, которые отвечают за белок–белковые взаимодействия (NHR1 домен), гомо – и гетеродимеризации белков семейства ETO (NHR2 домен), взаимодействие с некоторыми корепрессорами (NHR3 и NHR4 домены) [17, 18].

В результате транслокации t (8;21) (q22;p22) образуется ген AML1 – ETO,

кодирующий слитный белок, который является транскрипционным фактором. Белок AML1 – ETO содержит N – концевую часть белка AML1, включая RHD – домен (ДНК – и CBF β – связывающий), в то время как C – концевая часть принадлежит белку ETO, включая все его четыре домена NHR. Роль белка AML1 – ETO в развитии лейкоза обусловлена доминантно – негативным влиянием на транскрипционную активность белка AML1, что приводит к угнетению функции дифференцировки клеток миелоидного и эритроидного рядов [14].

Яркой клинической характеристикой ОМЛ с t (8;21) являются хлоромы – «солидные» очаги экстрамедуллярного поражения лейкоэмическими клетками, которые встречаются у 20 % больных и часто располагаются не в коже, а в других органах и тканях [18]. Наиболее характерным является поражение костей и мягких тканей орбиты, кроме того, могут быть поражены оболочки черепно – мозговых нервов, внутренние органы, кости. Хотя наличие t (8;21) и является фактором благоприятного прогноза, хорошие результаты достигаются только при интенсивной химиотерапии. Вероятность рецидива для пациентов с t (8;21), достигших ремиссии, составляет около 25 %, а общая 4 – летняя выживаемость – 60 – 70 % [14, 17].

1. 5 Транслокация t (1;19) (q23; p13) E2A (TCF3) – PBX1

Транслокация t (1;19) (q23; p13) характерна для В – клеточного ОЛЛ лейкоза, где частота ее составляет 5 – 6% случаев. На молекулярно – генетическом уровне результатом данной транслокации является образование химерного транскрипта E2A – PBX1 [14]. При исследованиях было установлено, что один из разрывов (19p13) проходит через ген E2A — регулятор (усилитель) работы иммуноглобулиновых генов. Второй разрыв расчленяет ген PRL (pre – В – leukemia), локализованный в 1q23. Из образовавшихся фрагментов формируется новый химерный ген и продуцируется химерный белок со значительным онкогенным потенциалом.

TCF3 (Transcription Factor 3) принадлежит к семейству E белков, которые являются транскрипционными факторами. E белки активируют транскрипцию путем связывания с регуляторными последовательностями E-box на генах-мишенях в качестве гетеро– или гомодимеров. E белки играют важную роль в лимфопоэзе, они кодируют белок необходим для развития В и Т лимфоцитов. Снижение активности кодируемого белка является причиной развития лимфоидных злокачественных опухолей [19].

Ген PBX кодирует ядерный белок, относящийся к семейству транскрипционных факторов PBX. Исследования на мышах предполагают, что этот ген может участвовать в регуляции остеогенеза и необходим для скелетного паттерна.

Транслокация t (1;19) характеризуется высоким лейкоцитозом и сравнительно неблагоприятна в прогностическом отношении: 45% детей переживает 3 года с момента постановки диагноза; этот показатель значительно ниже, чем при ОЛЛ с числом хромосом более 50 [14].

1.6 Минимальная остаточная болезнь (МОБ)

Ответ на терапию ОЛ уже в течение длительного времени используется как один из важнейших факторов прогноза и стратификации пациентов по группам риска [20]. На сегодняшний день наиболее эффективным способом прогнозирования развития рецидивов считается определение МОБ [21]. Наличие МОБ в костном мозге является важным прогностическим фактором при ОЛ у детей и взрослых [22]. Под минимальной остаточной болезнью понимают наличие в организме больного опухолевых клеток в количествах, не распознаваемых стандартными цитологическими методами [5]. МОБ является основной причиной рецидивов, и дальнейшая поддерживающая терапия бывает направлена именно на уничтожение остатков опухолевых клеток [23].

Наибольшее значение имеет оценка МОБ по завершении первого этапа терапии. В серии исследований было показано, что статус МОБ по завершении 4–6 недельной интенсивной терапии является наиболее значимым

прогностическим фактором, позволяющим выявить группу с низкой вероятностью рецидива (<5%) и группу с вероятностью рецидива, превышающей 75%. Как и ранний ответ на терапию, исследование МОБ является отражением биологических особенностей опухоли, ее чувствительности к проводимой терапии, а также индивидуальных вариаций метаболизма химиопрепаратов. В большинстве современных протоколов окончательное определение группы риска проводится в соответствии со статусом МОБ на исходе первого этапа терапии. Дополнительный контроль МОБ на более отдаленных сроках позволяет выявить группу пациентов, которым необходима максимально-эффективная терапия, вплоть до выполнения пересадки кроветворных стволовых клеток в первой ремиссии [23].

Количественная диагностика МОБ важна практически на всех стадиях лечения ОЛ [24]. При использовании современных препаратов на ранних этапах лечения содержание лейкозных клеток быстро снижается до уровня, где невозможно обнаружить опухолевые клетки, и определение МОБ на этом этапе лечения служит прогностической информацией. Исследования показали, что пациенты, у которых не обнаруживают МОБ, имеют хороший прогноз и не нуждаются в дальнейшем интенсивном лечении, в отличие от пациентов с высоким уровнем МОБ, которые нуждаются в экстренной необходимости интенсификации лечения [25]. Отслеживание МОБ важно не только для контроля течения и прогноза заболевания, но и для выбора наиболее эффективной и сопряженной с меньшим риском стратегией лечения.

Мишенью при исследовании МОБ, как уже было отмечено выше, является клоноспецифичная характеристика лейкемических клеток, позволяющая достоверно выявить и количественно охарактеризовать небольшую опухолевую популяцию на фоне избытка нормальных форменных элементов крови или костного мозга [23]. Существует несколько различных методов выявления МОБ: ПЦР, многоцветная проточная цитометрия, а также метод электрофоретического исследования [21].

1.7 Экспрессия гена WT1 для определения МОБ

Для определения МОБ при ОЛ в последние годы стали применять экспрессию гена WT [7].

Ген WT1 (Wilm`s tumor) кодирует фактор транскрипции, необходимый для нормального развития клеток и их дифференцировки, является важной регуляторной молекулой, играющей важную роль в клеточном росте и развитии. Свое название он получил от опухоли Вильмса. При мутации обоих аллелей этого гена у детей развивались опухоли почки, и первоначально его относили к гену супрессору опухоли [7, 26]. Однако эти данные не согласовались, с тем фактом, что паталогическая экспрессия гена встречается в опухолевых клетках при широком спектре как солидных опухолей, так и гематологических новообразованиях. В пренатальном развитие человека экспрессия WT1 встречается в основном в мочеполовой системе. Во взрослых тканях (в постнатальном периоде), у взрослого человека WT1 экспрессируется в клетках мочеполовой, центральной нервной системах и в тканях, участвующих в гемопоэзе, включая костный мозг и лимфатические узлы. Установлено, что WT1 экспрессируется на уровне клеток – предшественниц или на более поздних этапах, а его важное место в гемопоэзе связано с регуляцией пролиферации и дифференцировки [7].

Ген WT1 (50 кб) располагается на коротком плече хромосомы 11 (11p13 – локус) и состоит из 10 экзонов, которые образуют мРНК длиной 3 кб. Он способен активировать или ингибировать гены в зависимости от клеточного типа и гена мишени [27]. Экзоны 1 – 6 включают N – терминальный регуляторный домен, богаты пролином и глутамином, а экзоны с 7 – 10 содержат цинковые пальцы, облегчающие связывание ДНК и составляют C – терминальный домен [28].

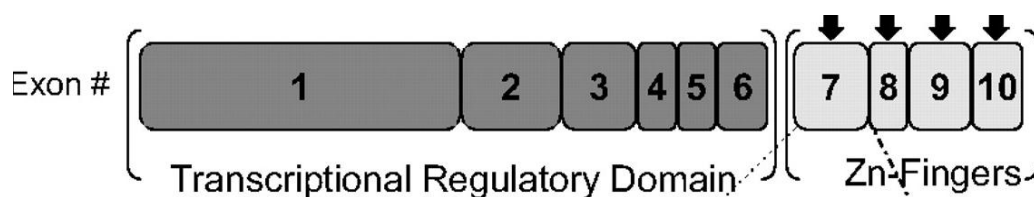


Рисунок 1 – Строение гена WT1 [27]

Для данного транскрипционного фактора характерно до 24 различных изоформ, которые являются результатом комбинации альтернативного сплайсинга. Белок WT1 может действовать как транскрипционный активатор или транскрипционный репрессор, в зависимости от уровня экспрессии, специфической изоформы и клеточного контекста. В результате альтернативного сплайсинга роль данного белкового регулятора транскрипции в развитие опухолей представляется непростой [7, 26, 28].

В последние годы встречаются исследования, где описана сверхэкспрессия WT1 дикого типа при различных опухолевых заболеваниях человека, имеющих как гематологическое, так и не гематологическое происхождение. Сверхэкспрессия WT1 наблюдается как при ОЛЛ (как в В-клетках, так в и Т-клетках), так и при ОМЛ. Кроме того, повышение экспрессии данного гена было описано при хроническом миелобластном лейкозе (ХМЛ) и миелодиспластическом синдроме (МДС) [28]. Гиперэкспрессия структурно не измененного гена присуща, прежде всего, пациентам с ОМЛ. На этапах первичной диагностики высокая экспрессия гена наблюдается у 90% больных с ОМЛ. Уровень экспрессии зависит от содержания бластных клеток в костном мозге. При рецидивах данный параметр выражен сильнее, в то время как на этапах полной ремиссии он нормализуется. У части больных после химиотерапии и трансплантации костного мозга (гемопозитических стволовых клеток), уровень экспрессии снижается. В то же время у других больных ОМЛ этого не наступает, что может быть объяснено резистентностью лейкозных клеток к химиотерапии или прогрессировании опухоли. В работе китайских исследователей 2015 года показано, что высокая экспрессия гена у пациентов ОМЛ связана с ухудшением показателей общей и без рецидивной выживаемости. Показано, что экспрессия гена после завершения терапии или в пост трансплантационный период имеет неблагоприятное прогностическое значение. К благоприятным прогностическим параметрам можно отнести быстрое снижение транскрипта WT1 [7].

Результаты определения уровня экспрессии у больных ОЛЛ с практической целью использовались неоправданно мало. Их прогностическая значимость, по крайней мере, при ОЛЛ у детей, считает недостаточной. [28]

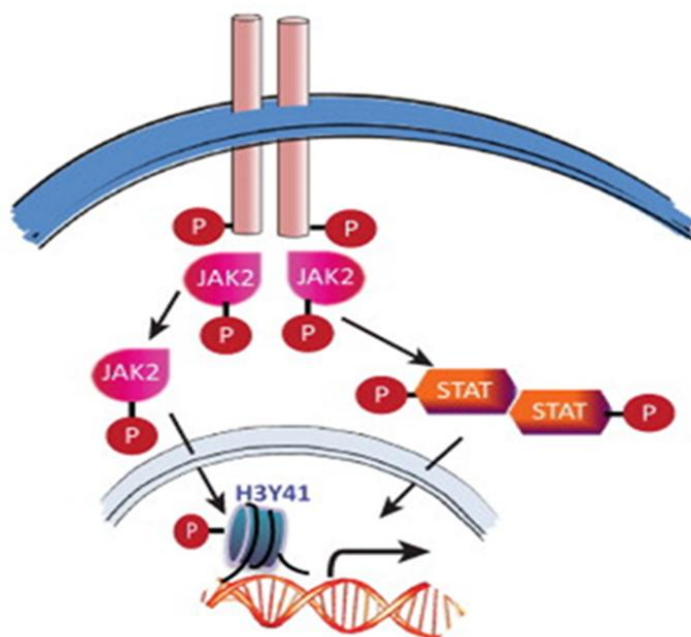
1.8 JAK2-STAT Сигнальный путь

К центральным регуляторам гомеостаза относится цитокиновая система, обладающая широким спектром биологических эффектов. Известно, что функционирование цитокиновой сети в норме и при патологии базируется на механизмах, лежащих в основе регуляции экспрессии генов цитокинов. Экспрессия генов подразумевает под собой процесс реализации закодированной в структуре ДНК информации на уровне мРНК. В норме многие гены не экспрессируются, а степень экспрессии имеет высокую индивидуальную вариабельность [29].

Экспрессия гена JAK2 приводит к образованию белка JAK2, принадлежащего к семейству нерецепторных тирозинкиназ (Janus-киназ) и являющегося одним из составляющих цитокиновой системы. Белки JAK2 экспрессированы в различных тканях и активируются множеством цитокинов. Цитокиновая система осуществляет стимуляцию, пролиферации и дифференцировки различных типов клеток предшественников в костном мозге, осуществляет активацию специфического иммунитета, активацию пролиферацию фибробластов и эпителиальных клеток, активацию гуморального иммунитета, иммуномодулирующее действие, регуляцию воспаления, ангиогенеза, функционирования нейронов, эмбрионального развития и регенерации тканей. Для гемопоэза белок JAK2 имеет особое значение, так как осуществляет передачу сигнала не только от эритропоэтина, но и от тромбопоэтина и колониестимулирующего фактора гранулоцитов [30].

Функция белков JAK 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.



TRENDS in Pharmacological Sciences

Рисунок 2 – JAK – STAT сигнальный путь [31]

Все члены семейства Янус – киназ (JAK1, JAK2, JAK3) и тирозинкиназа 2 (Тук2) имеют активный киназный домен JH1 и сходный по строению домен JH2, осуществляющий функцию подавления активности киназы. При связывании определенных цитокинов или факторов роста эритропоэтин, тромбопоэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г – КСФ), интерферон-γ связываются с рецепторами JAK – киназ на поверхности клетки, JAK – киназы активируются (фосфорилируются). Далее происходит последовательное фосфорилирование (активирование) белков семейства STAT (передатчик сигнала и активатор транскрипции). Активация путей JAK2 также приводит к активации сигнальных путей с участием митоген-активированного протеина (MAP – киназы), фосфатидилинозитол – 3 – киназы АКТ (PI3K – АКТ), которые передают сигналы для выживания, пролиферации и дифференцировки эритробластных предшественников.

При взаимодействии с определенными рецепторами их лигандов (эритропоэтина, колониестимулирующих факторов, интерлейкинов и др.)

происходит изменение конформации рецепторов таким образом, что снимается ингибирующее воздействие JH2 – домена и происходит аутофосфорилирование JAK – киназы. Далее активированная киназа фосфорилирует целый ряд белков (семейство STAT, фосфатидилинозитол-3-киназа АКТ, MAP – киназа), которые передают сигналы, направленные на выживание, активацию пролиферации и дифференцировки клеток – предшественников [31, 32].

Имеются данные, где описано, что при ОМЛ у взрослых повышается уровень экспрессии не мутантного JAK2. Оценка экспрессии JAK2 у детей не проводилась [33].

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Объектом исследования для анализа хромосомных транслокаций/ химерных транскриптов и определения уровня экспрессии генов WT1 и JAK2 служила РНК, выделенная из лейкоцитов аспирата костного мозга детей с подтверждённым диагнозом лейкоз, находившихся на стационарном лечении в отделении онкологии и гематологии КГБУЗ «Красноярского краевого клинического центра охраны материнства и детства» (г. Красноярск), в период с 09. 2012 г. по 06. 2017 г. Работа проводилась на базе Красноярского филиала Гематологического центра и КГБУЗ Красноярского краевого клинического центра охраны материнства и детства.

У детей, особенно у новорожденных и грудных, предпочтительно делать пункцию в верхней трети большеберцовой кости с внутренней стороны дистального эпифиза бедренной кости или пяточной кости. Пункцию подвздошной кости производят на 1–2 см кзади от передней верхней ости ее гребешка. Можно пунктировать ребра и остистые отростки позвонков (удобнее – 3–4–й поясничные позвонки).

2.2 Выделение лейкоцитов из костного мозга

1. Образец костного мозга отбирается в пробирку с ЭДТА. Объем костного мозга отбирается в пробирку с ЭДТА. Объем костного мозга 2–3 мл. Если объем костного мозга меньше 2 мл, доводим раствором NaCl 0,9%. Аналогично поступаем с объемом 3 мл, (объем не должен быть значительно меньше 3 мл, чтобы не сильно разводить образец).

2. . Проведение гемолиза (разрушение эритроцитов). К образцу крови или костного мозга добавляется 0,8% раствор NH₄Cl в соотношении 1:4 (1 часть крови или костного мозга вместе с ЭДТА + 4 части 0,8% NH₄Cl, (например , 2мл крови + 8 мл 0,8% раствора NH₄Cl).

3. Откручиваем пробы на клеточной центрифуге (можно без охлаждения) при 3000 об/мин на 10 мин.

4. Лейкоциты образуют белый осадок. Если осадок красный, процедуру с NH_4Cl нужно повторить (без отстаивания 10 мин). Сливаем супернатант, наклоня пробирку.

5. К осадку лейкоцитов добавляем лизирующий буфер (RLT для Qiagen или раствор D для Рибозоля – D). Если клетки образуют на дне тонкое кольцо, берем 350 – 400 мкл лизирующего буфера, если осадок хорошо заметный (толщиной 1 – 2 мм от дна) 500 – 600 мкл и т.д. – 7 мм осадок – 1500 мкл буфера, 5 мм – 1000 мкл буфера, 4 – 3 мм – 500 – 600 мкл. Показатель нужной консистенции – умеренно вязкий раствор, при заборе раствора в наконечник пипетки за концом пипетки тянется тонкая «ниточка» Если раствор легко пипетируется и не образует ниточки – буфера слишком много, раствор жидкий. Если буфера мало – раствор плотный, густой как желе. Густой раствор можно далее развести. Чтобы раствор не получился жидкий – нужно добавлять меньший объем сначала, и смотреть, как растворяется, далее добавлять по необходимости еще.

6. Ресуспендируем лейкоциты в лизирующем буфере. После лизиса раствор может быть немного вязким и тянущимся.

7. Перносим все содержимое пробирок в чистый эппендорф.

8. Хранятся образцы при -20°C .

2. 3 Выделения РНК из лейкоцитов костного мозга с помощью комплекта реагентов «РИБО-золь-D» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»).

Выделения РНК из клинического материала с помощью комплекта реагентов «РИБО-золь-D» проводилось по следующей методике:

1. Добавить к образцам лизированным в растворе D, по 40 мкл раствора E. Перемешать и центрифугировать.

2. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора A, перемешать, центрифугировать.

3. Добавить в пробирки по 130 мкл раствора В. Перемешать на вортексе 1-2 мин.
4. 4.Поставить пробирки в морозильную камеру с температурой не выше минус 16°С на 10 мин.
5. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10-16 g.
6. Во время центрифугирования образцов приготовить новые пробирки объёмом 1,5 мл, в количестве соответствующем количеству обрабатываемых образцов, включая контроли. В каждую внести по 400 мкл раствора С и по 10 мкл гликогена 1%.
7. С образцов после центрифугирования отобрать верхнюю фазу, и перенести в пробирки, содержащие раствор С.
8. Перемешать на вортексе, центрифугировать, поставить в морозильную камеру с температурой не выше минус 16°С на 20 мин.
9. Поместить флакон с раствором для отмывки 3 в морозильную камеру с температурой не выше минус 16°С.
10. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 –16 тыс g и отобрать надосадочную жидкость.
11. Осадок ресуспендировать в 800 мкл холодного раствора для отмывки 3. Перемешать на вортексе и центрифугировать 10 мин при 10 –16 тыс g, отобрать надосадочную жидкость.
12. Подсушить осадок в термостате при температуре 56°С в течение 5 – 7 мин.
13. Растворить осадок в 20 мкл РНК –элюента bcr-abl, прогреть при температуре 56°С в течение 2 –3 мин.
14. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

2.4 Измерение концентрации РНК

В образец вводится флуоресцентный зонд, который специфически связывает целевую молекулу, образуя флуоресцентный комплекс. Источник света возбуждает флуоресценцию, которая пропорциональна концентрации

определяемого вещества. Прибор измеряет интенсивность свечения и рассчитывает концентрацию.

Измерение концентрации РНК с использованием набора реагентов QuantiTTM ssRNA Assay Kit и флуориметра Qubit (Invitrogen) производилось согласно следующей методике:

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

2. Приготовить Рабочую смесь: $1 \times n$ мкл Реагента + $199 \times n$ 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 РНК;

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 (dsRNA 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 РНК в исходном образце: выбрать Calculate sample concentration используя кнопки ↑ и ↓, нажать GO.

11. Записать результаты

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

2. 5 Проведение Обратной транскрипции

Обратная транскрипция (ОТ) – процесс синтеза копий ДНК (комплементарной ДНК, кДНК) на матрице одноцепочечной РНК. Данный процесс катализирует специальный фермент – обратная транскриптаза (ревертаза). Данный процесс ведет к образованию кДНК, которую используют как матрицу в мультиплексной «гнездовой» двухэтапной ПЦР [34].

ОТ – ПЦР используют для выявления молекул РНК. Метод возник как последовательное проведение двух реакций. В ходе первой стадии – обратной транскрипции с помощью одного праймера, комплементарного исследуемой РНК, субстратов реакции (dNTPs) и матрицы РНК происходит ферментативный синтез кДНК с матрицы РНК. Вторая стадия – это классическая ПЦР. Первую стадию проводят с использованием мезофильной ревертазы (фермента, синтезирующего кДНК на матрице РНК) [35].

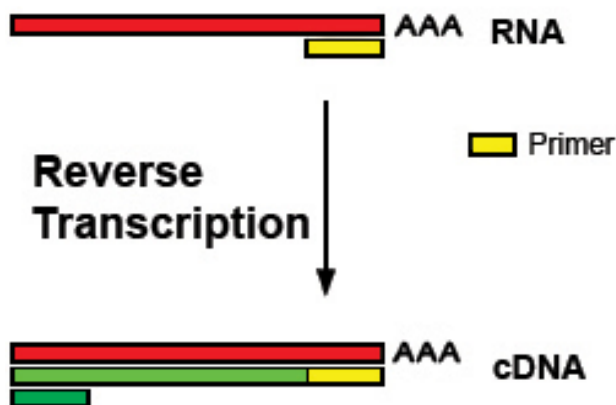


Рисунок 3 – Схема обратной транскрипции [34]

Постановка ОТ с использованием тотальной РНК, выделенной из клинического материала, проводилась по следующей методике:

1. Разморозить РНК и приготовить пробирку 1,5 мл по одной на каждый образец.

2. Внести в пробирку 2 мкл раствора «ПР–ОТ» и добавить 13 мкл исследуемой РНК. Инкубировать 3 мин при температуре 70°C, затем перенести в лед на 1 мин.

3. Во время инкубации приготовить смесь (из расчета 1 пробирка для анализа одного пациента, умноженную на количество пациентов–N). Для этого внести в пробирку:

Реагенты	Объём, мкл
Деп – В	4,9 x (N)
ОТ – буф	2,5 x (N)
дНТФ – 1	1,2 x (N)
RNAsin	0,4 x (N)
Общий объем	9 x (N)

4. Полученную смесь встряхнуть, центрифугировать 10с 1000gi внести по 9мкл в пробирку с РНК, мягко перемешать, сбросить капли, инкубировать при температуре 42°C 5 минут.

5. Добавить 1 мкл MMLV в каждую пробирку. Продолжить инкубацию в течение 1.5 часа при 42°C. По завершении ОТ инкубировать 10 минут при 70°C. По завершении ОТ инкубировать 10 минут при 70°C. Полученную кДНК хранить при температуре –20°C.

2.6 Проведение первого этапа ПЦР

Первая стадия ПЦР проводится с использованием высокоспецифичных праймеров для получения высокоспецифичных копий фрагментов кДНК в случае присутствия хромосомных транслокаций в исследуемом образце

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод, основанный на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце [35].

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК – матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента.
- Термостабильная ДНК–полимераза – фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК.
- Дезоксинуклеотидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции – рН, ионную силу раствора.

В процессе реакции амплификации с ДНК происходит ряд событий, обеспечиваемых определенными температурными циклами. Обычно при проведении ПЦР выполняется 20 – 35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий [36].

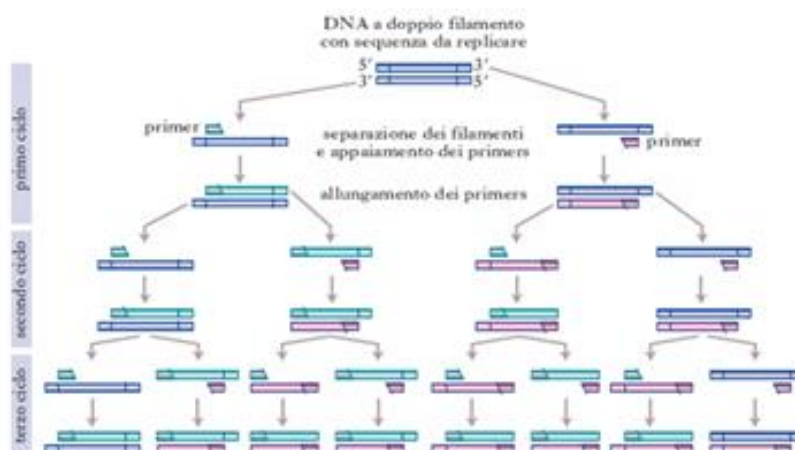


Рисунок 4 – Схематическое изображение первого цикла ПЦР [36]

Этапы ПЦР:

1. Денатурация – разрушение водородных связей между двумя цепями ДНК.
2. Отжиг – присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени.
3. Элонгация (синтез) – ДНК–полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы [35, 36].

Проведения первого раунда ПЦР проводилось по следующей методике (в случае проведения анализа на наличие хромосомных транслокаций):

- 1) Приготовить 5 пробирок на каждого пациента.
- 2) Внести в каждую пробирку по 1 мкл раствора «ПР-1.1», «ПР-1.2», «ПР-1.3», «ПР-1.4», «ПР-1.5» соответственно.
- 3) Приготовить смесь (из расчета на 5 пробирок, необходимых для анализа одного пациента и умножить на количество пациентов –N). Для этого в пробирку вместимостью 1.5 мл внести:

Реагенты	Объем, мкл
Вода стерильная(В)	82,5х(N)
ПЦР-буф	12,5х (N)
MgCl ₂	10X(N)
дНТФ-1	2,5х(N)
Taq	2,5х(N)
Общий объем	110х(N)

4. Полученную смесь встряхнуть, центрифугировать 10 с 1000g и внести по 22 мкл в пробирки с праймерами. Добавить по 2 мкл ДНК. Встряхнуть и центрифугировать 10 с 1000g.

5. Перенести пробирки в ДНК амплификатор и провести амплификацию по следующей программе:

6.

Шаг программы	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
1	+ 94 (начальная денатурация ДНК)	3 мин	1
3	+ 94 денатурация (ДНК)	30 сек	25
	+ 60 (отжиг праймеров)	30 сек	
	+ 72 (удлинение фрагментов)	30 сек	
4	+ 72 (завершающая элонгация)	2 мин	1

2.7 Проведение второго этапа ПЦР

Вторая стадия ПЦР является «гнездовой» и проводится с использованием флуоресцентно–меченного дУТР для дальнейшего увеличения копий фрагментов кДНК и получение ПЦР–продукта для последующей визуализации результатов гибридизации на биологическом микрочипе. Ее проводят с помощью праймеров, несущих флуоресцентную метку на 5'–конце.

«Гнездовая» («nested») ПЦР используется для детекции ДНК в следовых количествах (1–100 копий на пробу). Праймеры для «гнездовой ПЦР» подбираются таким образом, чтобы места гибридизации праймеров для второй ПЦР находились внутри участка ДНК, ограниченного праймерами для первой ПЦР. Таким образом, специфический продукт первой ПЦР может служить матрицей во второй ПЦР, а неспецифические продукты, если они образуются в течение первой реакции, выступать в роли матрицы во второй ПЦР не могут. «Гнездовая ПЦР» требует для выполнения анализа несколько большего времени, но позволяет добиться повышения чувствительности и специфичности анализа [36].

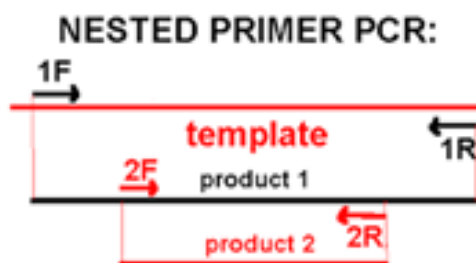


Рисунок 5 – Схема подбора праймеров при «Гнездовой» ПЦР [36]

Проведения второго раунда ПЦР (в случае проведения анализа на наличие хромосомных транслокаций) проводилось по следующей методике:

- 1) Приготовить пробирки (5 шт.) для проведения амплификации.
- 2) Внести в каждую пробирку по 1 мкл раствора «ПР-2.1», «ПР-2.2», «ПР-2.3», «ПР-2.4», «ПР-2.5». Приготовить смесь (из расчета на 5 пробирок, необходимых для анализа одного пациента и умножить на количество пациентов–N). Для этого в пробирку вместимостью 1,5 мл внести:

Реагенты	Объём, мкл
Вода стерильная (В)	88,7 x (N)
ПЦР – буф	12,5 x (N)
MgCl ₂	10 x (N)
дНТФ – 2	3,25 x (N)
Taq	2,5 x (N)
Общий объём	117 x (N)

3) Полученную смесь встряхнуть, центрифугировать 10с 1000ги внести по 23 мкл в пробирки с праймерами. Добавить 0,5 мкл ПЦР продукта из 1 этапа. Центрифугировать 10 с 1000 g.

4) Перенести пробирки в ДНК амплификатор и использовать для амплификации программу ПЦР 1 раунда.

2. 8 Проведение гибридизации на биологическом микрочипе «ЛК-БИОЧИП»

При постановке диагнозов и лечении лейкозов большое значение имеют не только клинические данные, но и результаты молекулярно–генетического анализа. В настоящее время известно более 50 различных транслокаций, характерных для определенных типов лейкозов. Многие из этих транслокаций приводят к аномальной экспрессии соответствующих белков [37].

Биологический микрочип представляет собой подложку (предметное стекло/полимерный материал) с иммобилизованными зондами, специфическими к определенным типам транслокаций. Иммобилизуемые молекулы принято называть зондами, а те молекулы, которые находятся в исследуемом образце и подвергаются анализу – мишени. Ячейки с иммобилизованными зондами располагаются упорядоченными рядами, причем каждая ячейка содержит уникальный индивидуальный зонд. В зависимости от типа биочипа диаметры гелевых ячеек варьируют от 50 до 300 мкм, а расстояния между ячейками от 100 до 500 мкм. В качестве метки при регистрации результатов анализа используют флуоресцентные красители [38]. Количество ячеек на биочипе зависит от сложности анализируемой мишени (ей) и задач эксперимента и составляет от нескольких десятков до нескольких

тысяч. Зонды иммобилизуют в ячейки, расположенные рядами; причем в каждой отдельной ячейке иммобилизованы зонды с определенной специфичностью. Иммобилизация осуществляется за счет образования ковалентных связей при облучении ультрафиолетовым излучением или с использованием химических реагентов. В основе принципа работы всех молекулярных биочипов с иммобилизованными зондами лежит способность биологических макромолекул к молекулярному узнаванию (высокоспецифичному избирательному связыванию с другими молекулами). Так, образование дуплексов ДНК подчиняется правилу Уотсона—Крика, $A \leftrightarrow T$ и $G \leftrightarrow C$.

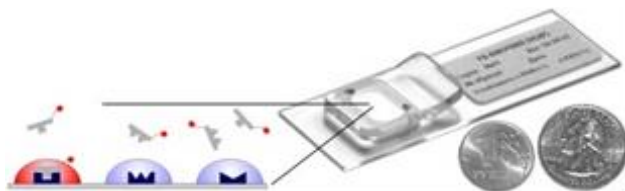


Рисунок 6 – Схема Биочипа [38]

Транслокация определяется при возбуждении флуоресценции меченного ПЦР продукта, связавшегося с зондами, иммобилизованными на биологическом чипе. Если соответствие между иммобилизованными молекулярными зондами и мечеными анализируемыми молекулами в растворе точно удовлетворяет условиям молекулярной комплементарности, то образующиеся комплексы будут термодинамически наиболее устойчивы [39].

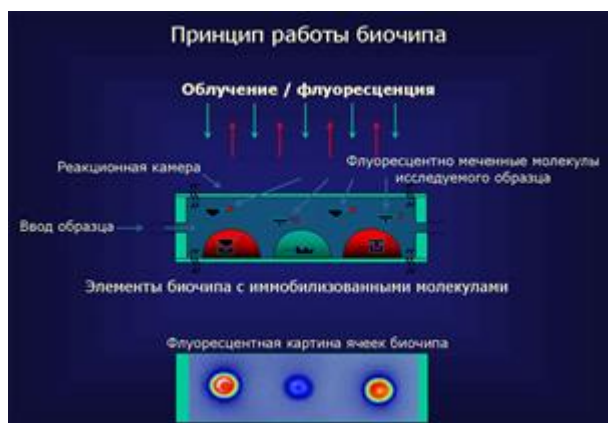


Рисунок 7 – Принцип работы Биочипа [39]

Проведение гибридизации на биологическом микрочипе проводилось по следующей методике:

1. Приготовить пробирки для проведения гибридизации (из расчета 1 пробирка на одного пациента).
2. Продукты амплификации по 6,5 мкл после для 1 пациента смешивают с 12 мкл раствора «ГБ», полученную смесь встряхивают центрифугированием при комнатной температуре в течение 10 с при 1000 g.
3. Готовую гибридизационную смесь денатурируют при +95 градусах Цельсия в течение 5 минут, охлаждают 2 мин во льду. Вносят в полном объеме (35 мкл) на микрочип внутрь гибридизационной кемеры через отверстия в крышке, после чего закрывают плотно крышку.
4. Гибридизацию проводят в закрытом суховоздушном термостате (в темноте) при 37 градусах Цельсия в течение 14–18 часов.
5. По окончании гибридизации камеру удалить. Микрочип промыть в растворе промывочного буфера в течение 15 минут.
6. Высушить микрочип на воздухе до полного исчезновения капель на поверхности подложки 10–30 минут.

2.9 Определение уровня экспрессии WT1 и JAK с использованием метода ПЦР – РВ

Все Системы определения экспрессии генов (выявление уровня представленности транскриптов) можно разделить на два способа:

1. Абсолютный подход количественной оценки уровня экспрессии гена заключается в том, что количество выхода гена определяется на основе стандартной кривой (сравнивается с образцом с известным количеством копий определенной ДНК или РНК на единицу объема).
2. Относительный подход измерения уровня экспрессии основан на использовании референсных транскриптов (гены домашнего хозяйства – «housekeeping gene»), продукты которых необходимы для обеспечения функции любого типа клеток, экспрессии уровни их остаются относительно стабильными в ответ на любое лечение и экспрессируются в клетках всегда.

Метод $2^{-\Delta\Delta CT}$ показывает относительную количественную оценку интересующего гена в сравнении с референсным геном или геном «домашнего

хозяйства», продукты которого необходимы для обеспечения функции любого типа клеток. Гены домашнего хозяйства обычно используются, потому что их уровень экспрессии остается относительно стабильным в ответ на любое лечение, и экспрессируются в клетках всегда. Метод $2^{-\Delta\Delta CT}$ предполагает равномерную эффективность ПЦР – амплификации во всех образцах равную 100%. Значение 2 равно эффективности ПЦР-амплификации (100%), в идеале количество продуктов амплификации с каждым циклом увеличивается вдвое.

Отличительными чертами метода ПЦР – РВ, является возможность количественного определения ДНК/ РНК в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза, и автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

Детекция продуктов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени стала возможной благодаря введению в реакцию флуоресцирующих агентов, сообщающих об увеличении ДНК пропорциональным увеличением флуоресцентного сигнала. К флуоресцирующим веществам, используемым для этой цели, относятся красители, связывающие ДНК.

В 1991 г. П. Холланд с соавторами предложили использовать 5'—>3'-экзонуклеазную активность Taq- полимеразы для контроля за эффективностью прохождения циклов ПЦР по освобождению в реакционную смесь флуоресцентной метки, ассоциированной с 5'-концевым нуклеотидом зонда. Именно этот подход лег в основу одного из наиболее широко распространенных современных методов количественной ПЦР в реальном времени. При реализации этого подхода обычно используют Taq- или Tth-полимеразы, однако, в принципе, те же функции может выполнять любая другая ДНК- полимераза, обладающая 5'—>3'-экзонуклеазной активностью. В реакционную смесь, кроме двух обычных праймеров, добавляют олигонуклеотидный зонд, меченный по 5-концу флуорофором, а также содержащий в своей центральной или 3-концевой части тушитель флуоресценции. Зонд отжигается в каждом цикле ПЦР с центральным участком ампликона между двумя амплифицирующими его праймерами. Для того, чтобы

сам зонд не использовался в качестве праймера, его 3'-концевую гидроксильную группу блокируют ортофосфатом.

По мере углубления ПЦР интенсивность флуоресценции реакционной смеси увеличивается. Точка, где флуоресценция впервые фиксируется достоверно выше исходного уровня называется пороговым циклом C_t . Значение C_t обратно пропорционально количеству амплифицируемой матрицы в пробе. Чем выше концентрация амплифицируемой последовательности в реакционной смеси, тем меньшее количество циклов требуется для того, чтобы интенсивность флуоресценции освободившегося флуорофора в пробе превысила базальный уровень.

Проведение ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени осуществлялось при помощи амплификатора IQ5 (Biorad). С помощью метода $2^{-\Delta\Delta C}$ осуществлялась обработка результатов ПЦР анализа. В качестве референсных генов использовали ABL (Абельсон лейкемия), GUS (Бета-глюкуронидаза), PVP (ТАТА-связывающий белок) [34].

ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени осуществлялась согласно методике разработанной в Красноярском филиале Гематологического научного центра:

1. Разморозить смеси WT1, JAK2, ABL, GUS, TBP при температуре, кратковременно центрифугировать на вортексе.
2. Подготовить в пяти пробирках необходимого объема реакционную смесь на гены WT1, JAK2, ABL, GUS, TBP из расчета на одного пациента:

Реагенты	Объем, мкл
Смесь WT1, JAK2, ABL, GUS, TBP	14,8
Тaq-полимераза	0,2

3. Смесь тщательно перемешать пипетированием (если объем <200 мкл) или импульсным вортексированием 15-20 раз.
4. Внести в приготовленные пробирки по 15мкл полученной рабочей смеси.

5. Внести по 10 мкл кДНК(предварительно кДНК разводится как 17 мкл TE – буфера + 3 мкл кДНК), в пробирки со смесями GAPDH и GAPDH.

6. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 1500-3000 об/мин при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе. Не менее чем за 10 минут до постановки включить систему для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени для прогрева.

8. Перенести пробирки в систему для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени в соответствии заданным ранее протоколом расположения образцов. Задать программу амплификации со следующими параметрами:

Шаг программы	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
1	+50	5 мин	1
2	+95	5мин	1
3	+95	15 сек	50
4	+60	1 мин	1

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

2.10 Статистическая обработка полученных результатов

Для оценки значимости отличий экспрессии генов, полученные результаты обрабатывались с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, который применяется для оценки различий между двумя независимыми выборками.

3. Результаты исследования

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОЛ – острый лейкоз

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ЮММЛ – ювенильный миеломоноцитарный лейкоз

ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз

МДС – миелодиспластический синдром

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МОБ – минимальной остаточной болезни

ОПЛ – острый промиелоцитарный лейкоз

РНК – рибонуклеиновая кислота

ОТ– обратная транскрипция

ПЦР– полимеразная цепная реакция

кДНК– комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК–матричная рибонуклеиновая кислота

JAK 2 – Янус-киназа 2

STAT – signal transducers and activators of transcription

A–аденин

T–тимин

C–цитозин

G–гуанин

дУТФ – дезокси–уридинтрифосфат

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Морозова, В. Т. Хронические лейкозы / В. Т. Морозова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2000. – Т. 12 –С. 25 – 32.
2. Коцкая, Н. Н. Медико–статистические характеристики и комплексная оценка результатов лечения острых лимфобластных лейкозов у детей / Н. Н. Коцкая // Сибирское медицинское обозрение. – 2011. – Т. 72. – С. 9-13.
3. Рулина, А. В. Активированные лейкозные онкогены AML1–ETO и C–KIT: роль в развитии острого миелоидного лейкоза и современные подходы к их ингибированию / А. В. Рулина, П. В. Спирин, В.С. Прасолов // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 349-386.
4. James, W. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes / W. James, A. Daniel. BLOOD. – 2009. –V.114. – 45 p.
5. Цаур, Г. А. Мониторинг химерных транскриптов с участием гена MLL для оценки прогностического значения минимальной остаточной болезни при остром лимфобластном лейкозе у детей первого года жизни, получающих терапию по протоколу mll-baby / Г. А. Цаур, А. М. Попов, Т. В. Наседкина // Издательство "Медицина". – 2012. – Т. 57. – С. 27.
6. Цаур, Г. А. Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом / Г. А. Цаур, Т. В. Наседкина, А. М. Попов // Онкогематология. – 2010. – Т. 2. – С. 46-54.
7. Мамаев, Н.Н. Гиперэкспрессия гена WT1 при злокачественных опухолях системы крови: теоретические и клинические аспекты (обзор

литературы). / Н. Н. Мамаев, Я. В. Гудожникова, А. В. Горбунова // Онкогематологи. – 2016. – Т. 9. – С. 257 – 259.

8. O'Sullivan, J. M.. JAK-STAT signaling in the therapeutic landscape of myeloproliferative neoplasms / J. M. O'Sullivan , C. N. Harrison // Molecular and cellular endocrinology. – 2017. – V. 71 – 79 p.

9. . Carter – Su, C. Role of the tyrosine kinase JAK2 in signal transduction by growth hormone / C. Carter – Su, L. Rui, J. Herrington. // *Pediatr Nephrol.* – 2000. – V. 14. – 550 p.

10. James, W. Vardiman. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes / Vardiman W. James, T. Ju"ergen // *BLOOD.* – 2009. – Т. 114. – 937 p.

11. Маколкин, В. И. Внутренние болезни. / В. И. Маколкин, С. И. Овчаренко, В. А. Сулимов // Учебник.. – 2012. – Т. 6. – С. 768.

12. Мухина, Н. А. Внутренние болезни / Н.А. Мухина, В.С. Моисеева, А.И. Мартынова //Учебник. – 2010. –Т. 2. – С. 1256.

13. Четвертина, Е. В. Нанокolonии и диагностика онкологических заболеваний, ассоциированных с хромосомными транслокациями / Е. В. Четвертина, А. Б. Четвертин // *Успехи биологической химии.* – 2010. – Т. 50. – С. 387-446.

14. Воробьев, А. И. Руководство по гематологии. / А.И Воробьев, Ю. Н. Андреев, З. С. Баркаган //Издательство "Ньюдиамед". – 2005. – Т. 5. – С. 413

15. Krzysztof, M. Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia / M. Krzysztof, David P. Harper // *Hematol Oncol Clin North Am.* – 2009. – Т. 23. – 991 p.

16. Dombret, H. Gene mutation and AML pathogenesis/ H. Dombret // *Blood.* – 2016. – V. 127. – 29–41 p.

17. Reikvam, H. Acute Myeloid Leukemia with the t (8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications / H. Reikvam, Kimberley J. H. , Astrid O. K. // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2011. – V. 2011. – 23 p.
18. Калинина, И. И. Клинические и генетические особенности острого миелоидного лейкоза с t(8;21) у детей и результаты терапии по протоколу ОМЛ-ММ-2000 / И. И. Калинина, М. М. Шнейдер, Н. П. Кирсанова, // Онкогематология. – 2011. – Т. 1. – С. 11 – 18.
19. Tirado, Carlos. A (1;19) translocation involving TCF3-PBX1 fusion within the context of a hyperdiploid karyotype in adult B-ALL: a case report and review of the literature / Carlos Tirado, David Shabsovich // Biomarker Research. – 2015. – 269-278 p.
20. Цаур, Г. А. Исследование минимальной остаточной болезни при острых лейкозах у детей в первом году жизни. / Г. А. Цаур, А. М. Попов, Л. Г. Фетчина // Методические рекомендации. – 2014. – С. 47.
21. . Цаур, Г. А. Методические основы диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах у детей первого года жизни / Г. А. Цаур, А. М. Попов, Л. Г. Фетчина // Онкогематология. – 2016. – Т. 11. – С. 16.
22. Цаур, Г. А. Сравнение результатов определения минимальной остаточной болезни в периферической крови и костном мозге у детей 1-го года жизни с острым лимфобластным лейкозом. Клиническая лабораторная диагностика / Г. А. Цаур, Т. О. Ригер, А. М. Попов // Клиническая лабораторная диагностика. – Т. 60. – С. 15.
23. Дагбашян, С. С. Мониторинг минимальной остаточной болезни в гематологической клинике. / С. С. Дагбашян, Л. С. Саакян, А. Г. Захарян // Научно – практический журнал Кровь . – 2013. – С. 44 – 52.

24. Campana, D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia / D. Campana // *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* – 2001. – Т. 23. – 1083–1098 p.
25. Szczepański, T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? / T. Szczepański // *Leukemia.* – 2007. – V. 21. – 622-626 p.
26. Morrison, Avril A. New insights into the function of the Wilms tumor suppressor gene WT1 in podocytes / A. Avril. Morrison, R. Rebecca Viney, Moin A. Saleem// *American Journal of Physiology.* – 2008. – V. 295. – 681- 692 p.
27. Smith, Shirley I. Expression of the Wilms' Tumor Suppressor Gene, WT1, Is Upregulated by Leukemia Inhibitory Factor and Induces Monocytic Differentiation in M1 Leukemic Cells / Shirley I. Smith, Dominique Weil, Gregory R. Johnson // *BLOOD.* – 1998. – V. 91. – 764-773 p.
28. Rampal, Raajit. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. / Raajit Rampal, Maria E. Figueroa // *Haematologica.* – 2017. – 672-679 p.
29. Бодиенкова, Г. М. Роль полиморфизма и экспрессии отдельных генов цитокинов в формировании патологии. Успехи современного естествознания / Г. М. Бодиенкова, Ж. В. Титова // *Успехи современного естествознания.* – 2015. – Т. 1. – С. 617.
30. Rawlings, Jason S. The JAK/STAT signaling pathway / Jason S. Rawlings, Kristin M. Rosler, Douglas A. Harrison // *Journal of Cell Science* – 2004. – 1281-1283 p.
31. Bench, Anthony J. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations / Anthony J. Bench, Helen E. White, Letizia Foroni // *British Journal of Haematology.* – 2013. – V. 160. – 25 – 34 p.

32. Соколова, Н. А. Изменения в представлении о патогенезе Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний / Н. А. Соколова, М. И. Савина // Молодой ученый. – 2011. – Т. 2. – С. 216 – 219.
33. Tamotsu, Irino. JAK2 V617F-Dependent Upregulation of PU.1 Expression in the Peripheral Blood of Myeloproliferative Neoplasm Patients / Irino Tamotsu, Uemura Munehiro, Yamane Humitsugu // PLoS One. – 2011. – V. 7. – 148 p.
34. Ребриков, Д. В. ПЦР «в реальном времени» / Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов // Бином. Лаборатория знаний. – 2009. – Т. 2. – С. – 226.
35. Полимеразная цепная реакция. Biomir. [В Интернете] [Цитировано: 23 Сентябрь 2014 г.] http://biomir.blogspot.ru/2012/02/blog-post_5633.html.
36. Higuchi, R. Kinetic. PCR Analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions / Kinetic R. Higuchi // Biotechnology. – 1993. – Т. 11. – 1026-1030 p.
37. Руководство по применению. ООО БИОЧИП-ИМБ "ЛК-БИОЧИП". [В Интернете] [Цитировано: 23 Сентябрь 2015 г.] <http://www.biochip-imb.ru/attachments/article/>
38. Грядунов, Д. А. Технология гидрогелевых биочипов и ее применение в медицинской лабораторной диагностике / Д. А. Грядунов, Д. В. Зименков, Т. В. Наседкина // Лаборатория. – 2009. – Т. 3. – С. 10 – 14.
39. Чечеткин, В. Р. Биочипы для медицинской диагностики / В. Р. Чечеткин, Д. В. Прокопенко, А. А. Макаров // Российские нанотехнологии. – 2006. – Т. 1. – С. 13 – 27.
40. Organista-Nava, Jorge. Survival of Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia / Jorge Organista-Nava, Yazmín Gómez-Gómez , Berenice Illades-Aguiar // Published: April 17. – 2013.

41. Reikvam, Håkon. Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications / Håkon Reikvam, Kimberley Joanne Hatfield, Astrid OlsnesKittang // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2011. – V. 20. – 23 p.

42. Ilencikova, Denisa. MLL Gene Alterations in Acute Myeloid Leukaemia (11q23/MLL+ AML. / Denisa Ilencikova, Alexandra Kolenova // Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic". – 2013.

43. Воробьев, А.И. Руководство по гематологии. / А.И Воробьев, Ю.Н.Андреев, З.С Баркаган // Издательство "Ньюдиамед". – 2005. – Т. 3. – С. 413.

44. Grimwade, D. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials/ D. Grimwade , Hills RK, Moorman AV, Walker H // Blood. – 2010. – 354 p.