

- окисления липидов в патогенезе хронических дерматозов и методы их коррекции: Сб. науч. тр./Под ред. В.С. Полканова. Свердловск: Изд. СГМИ, 1987. С. 30-41.
3. Кулаков В.И. Актуальность проблемы бесплодия в браке// Репродуктивная функция в супружеской паре: Тез.докл. республ. научно-практ. конф. Екатеринбург, 1994. С. 60-61.
 4. Осадчий П.В., Кузнецов Н.В., Чарушников Г.А. Роль активации перекисного окисления липидов в патогенезе нарушений репродуктивной функции у женщин, подвергающихся воздействию соединений хрома //Репродуктивная функция в супружеской паре. Там же. С. 79.
 5. Яцуха М.В. Бесплодные браки и болезни, передаваемые половым путем// Вопросы диагностики, лечения и профилактики ЗППП и дерматозов: Сб. научно-практ. конф. Рязань, 1995. С. 15-16.
 6. Beral V., Polfs R., Joesoef M.R. et al. Primary infertility: characteristics of women in North America Community Health. 1994. Vol.48. N 6. P. 576-579.

ПЕДИАТРИЯ

УДК 616.155.392.-07:577.21

А.Г. Сергеев, М.В. Стригалева,
Р.А. Иванов, Л.Г. Фечина

ВЫЯВЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОГО УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ BCR-ABL ГЕНА ПРИ "ADULT" ТИПЕ ХМЛ У ДЕТЕЙ

Межрегиональный детский онкогематологический центр ОДКБ №1, г.Екатеринбург

Подавляющее большинство случаев хронического миелоцитарного лейкоза (ХМЛ) характеризуется наличием в опухолевых клетках укороченной 22-ой (Филадельфийской или Ph) хромосомы, которая образуется вследствие реципрокной транслокации t(9;22). Результатом данной транслокации является формирование химерного BCR-ABL гена, экспрессия которого играет ведущую роль в патогенезе ХМЛ [7].

Хронический миелоцитарный лейкоз у детей является относительно редким миелопролиферативным заболеванием с неблагоприятным прогнозом. Так называемый "взрослый" (adult) тип ХМЛ ассоциирован с наличием в опухолевых клетках Ph хромосомы, в то время как при "ювенильном" (juvenile) типе Ph хромосома и функционирующий BCR/ABL ген не обнаруживаются. Диагностика ХМЛ у детей затруднена, поскольку далеко не всегда по данным цитологии и цитохимии можно однозначно подтвердить или отвергнуть диагноз. Заболеваниями, имеющими сходные с ХМЛ клинико-лабораторные признаки, являются хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), отдельные случаи миелодиспластического синдрома, а также ряд патологий, сопровождающихся лейкомоидными реакциями. Важнейшим дифференциально-диагностическим признаком "adult" типа

ХМЛ в этих случаях является обнаружение в опухолевых клетках Ph хромосомы цитогенетическим методом или химерных BCR/ABL транскриптов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Вопросы патогенеза ХМЛ у детей представляют особый интерес в связи с имеющимися сообщениями о различном уровне экспрессии BCR/ABL гена, выявляемом с помощью полимеразной цепной реакции, при ХМЛ в острой и хронической фазах заболевания [3, 4, 6, 8].

В данной работе представлены результаты карiotипирования и ПЦР-диагностики транслокации t(9;22) у 12 пациентов с направительным диагнозом ХМЛ в возрасте от 1 года до 14 лет. В каждом случае исследовали несколько образцов костного мозга, полученных в различные стадии заболевания. Цитогенетический анализ проводили по стандартной методике дифференциальной G-окраски хромосом [5]. ПЦР-анализ РНК, выделенной из проб костного мозга, проводили по ранее описанному методу "гнездной" ОТ-ПЦР (обратная транскрипция с последующей двухэтапной ПЦР). Обратную транскрипцию осуществляли с использованием "random" праймера [1].

Транслокация t(9;22)(q13;q34) была обнаружена цитогенетическим методом у шести пациентов. У трех больных хромосомные aberrации не были выявлены. В трех случаях карiotип опухолевых клеток определить не удалось.

Химерные транскрипты BCR-ABL типа b3a2, наличие которых свидетельствует о разрыве гена BCR в большом кластере точек разрыва (M-bcr), были выявлены у семи пациентов. У пяти больных не было обнаружено химерных транскриптов. Результаты ПЦР и цитогенетического исследования совпали во всех случаях. У пяти Ph-негативных и/или BCR/ABL-негативных пациентов диагноз "ХМЛ" в последующем был снят (табл. 1).

Результаты цитогенетического исследования и ПЦР-диагностики транслокации t(9;22) у больных ХМЛ

Пациент	Картиотип	Результат ПЦР	Диагноз ХМЛ
Б.Н., 3 года	46, XX, t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL ⁺	подтвержден
З.А., 10 лет	46, XY, t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL ⁺	подтвержден
Р.С., 3 года	46, XY, t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL ⁺	подтвержден
С.Г., 10 лет	46, XY, t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL ⁺	подтвержден
Г.И., 12 лет	45, XY, t(9;22)(q34;q11), -17	BCR-ABL ⁺	подтвержден
С.М., 9 лет	46, XX, t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL ⁺	подтвержден
В.П., 6 лет	не определен	BCR-ABL ⁺	подтвержден
Л.А., 1 год	46, XY	BCR-ABL ⁺	снят
С.Ж., 11 лет	46, XY	BCR-ABL ⁺	снят
Г.А., 12 лет	не определен	BCR-ABL ⁺	снят
М.Е., 14 лет	не определен	BCR-ABL ⁺	снят
К.Е., 11 лет	не определен	BCR-ABL ⁺	снят

При цитогенетическом анализе образцов костного мозга Ph-позитивных пациентов Филадельфийскую хромосому обнаруживали как в острой, так и в хронической стадиях заболевания. Однако у трех пациентов в хронической фазе при параллельном исследовании в ПЦР не удалось выявить химерных BCR-ABL транскриптов.

В последнее время в литературе появились сообщения о том, что количество химерных BCR-ABL транскриптов у детей, больных ХМЛ, может варьировать в широких пределах. По данным M.C.Malinge et al. [8], количество BCR-ABL транскриптов в хронической фазе на фоне лечения интерфероном резко снижается и может составлять тысячные доли процента от количества транскриптов интактного гена ABL. A. Gaiger et al. [3] установили, что низкое количество продуктов химерного гена в хронической фазе и увеличение их концентрации при наступлении бластного криза отражает не столько разную долю опухолевых клеток в образцах костного мозга и периферической крови, сколько изменение уровня экспрессии химерного BCR-ABL гена. В связи с этим нами было высказано предположение о том, что проведение обратной транскрипции в традиционном варианте с использованием "random" праймера не позволяет определить минимальные концентрации химерного транскрипта в исследованных образцах.

Считается, что проведение обратной транскрипции со специфическим праймером, комплементарным определенной области химерной м-РНК, позволяет значительно увеличить чувствительность ПЦР. Нами был проведен сравнительный анализ чувствительности ОТ-ПЦР с использованием "random" и специфического внешнего 3' праймера для индикации малых количеств BCR-ABL транскриптов (табл. 2). В качестве образцов, содержащих разное количество продуктов

химерного гена, использовали серийные разведения клеточной культуры K-562, несущей транслокацию t(9;22). Клетки K-562 смешивали с лейкоцитами здорового донора в соотношениях от 1:10 до 1:10⁷. Из каждого образца выделяли суммарную м-РНК, половину объема которой использовали в качестве матрицы для ОТ с "random" праймером, а другую половину - для ОТ со специфическим праймером. Результаты последующей ПЦР показали, что использование специфического праймера в ОТ позволяет на порядок повысить чувствительность реакции и обнаруживать присутствие одной опухолевой клетки среди 10⁶ нормальных лейкоцитов.

Пробы костного мозга пациентов, у которых в хронической фазе при наличии цитогенетически обнаруживаемой Ph хромосомы не удавалось выявить BCR-ABL транскрипты, исследовали в ОТ-ПЦР с применением на этапе обратной транскрипции специфического праймера. Положительные результаты, свидетельствующие о наличии в образцах продуктов химерного гена, были получены во всех трех случаях (табл.2).

Таким образом, для диагностики минимальной резидуальной болезни при "adult" типе ХМЛ необходимо использование наиболее чувствительного варианта ОТ-ПЦР, что может быть достигнуто применением на стадии обратной транскрипции специфического 3' внешнего праймера как альтернативы использованию "random" праймера. Полученные результаты свидетельствуют, что уровень экспрессии химерного BCR-ABL гена в период хронической фазы ХМЛ у детей в некоторых случаях значительно снижается. Поскольку ранним предвестником бластного криза может явиться повышение концентрации химерных транскриптов в опухолевых клетках, проведение количественно-

Таблица 2

Результаты ОТ-ПЦР с использованием в обратной транскрипции специфического и "random" праймера

Образцы	"Random" праймер	Специфический праймер
К-562 1:10	+	+
К-562 1:10 ²	+	+
К-562 1:10 ³	+	+
К-562 1:10 ⁴	+	+
К-562 1:10 ⁵	+	+
К-562 1:10 ⁶	-	+
К-562 1:10 ⁷	-	-
З.А. (бластный криз)	+	н.и.
З.А. (ремиссия)	-	+
Р.С. (бластный криз)	+	н.и.
Р.С. (ремиссия)	-	+
С.Г. (бластный криз)	+	н.и.
С.Г. (ремиссия)	-	+

Примечание:

"+" - обнаружены BCR-ABL транскрипты

"-" - не выявлены BCR-ABL транскрипты

"н.и." - не исследовали

го ПЦР-анализа может стать эффективным средством обнаружения экспансии опухолевого клона задолго до обострения заболевания.

Авторы выражают искреннюю благодарность научному руководителю работы профессору Ф. Ламперту, директору детской клиники Гиссенского университета, за большой вклад в создание лаборатории молекулярной генетики Детского онкогематологического центра г. Екатеринбург, а также его коллегам за консультативную и методическую помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеев А.Г., Фечина Л.Г., Иванов Р.А., Вострова Т.П. Редкий вариант молекулярной перестройки BCR-ABL гена, ассоциированной с Филадельфийской хромосомой//Вест. УГМА. Екатеринбург, 1995. №1. С.20-25.
2. Altman A.J. Chronic leukemias in childhood// Principles and practice of pediatric oncology. Eds.: Pizzo P.A., Poplack D.G. 2nd edition Philadelphia. 1993. P.501-518.
3. Gaiger A., Henn T., Borth E., Geissler K., Mitterbauer G., Maier-Dobersberger T., Greinix H., Mannhalter C., Haas O.A., Lechner K. et al. Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression//Blood. 1995. V.86, N6. P.2371-2378.
4. Hochhaus A., Lin F., Reiter A. et al. Quantification of residual disease in chronic myelogenous

leukemia patients on interferon-alpha therapy by competitive polymerase chain reaction//Blood. 1996. V.87, N4. P.1549-1555.

5. Lion T., Gaiger A., Henn T. et al. Use of quantitative polymerase chain reaction to monitor residual disease in chronic myelogenous leukemia during treatment with interferon// Leukemia. 1995. V.9, N8. P.1353-1360.
6. Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products//Science. 1990. V.247. P.199.
7. Malinge M.C., Mahon F.X., Delfau M.H., Daheron L., Kitzis A., Guilhot F., Tanzer J., Grandchamp B. Quantitative determination of the hybrid Bcr-Abl RNA in patients with chronic myelogenous leukaemia under interferon therapy//Br. J. Haematol. 1992. V.82, N4. P.701-707.
8. Toth F.D., Kiss J., Kiss A., Telek B., Olah E., Ivanyi J., Rak K. Co-expression of c-abl and c-myc oncogenes in Philadelphia chromosome-negative, bcr-negative chronic myeloid leukaemia//Leuk-Res. 1994. V.18, N5. P.373-380.
9. Human Cytogenetics: A Practical Approach/ ed. D.E. Rooney, B.H. Czepulkowski. IPL Press Oxford. Washington D.C. 1986. 242 p.