

- Изд-во Электротехнического университета.1993.4.3.С-743- 745.
12. Пестряев В.А. Управляемое воздействие импульсного электромагнитного поля на центральную нервную систему//Биофизика.1994.Т.39. Вып.3.С.515-518.
 - 13.Плеханов Г.Ф. Основные закономерности низкочастотной электромагнитобиологии. Томск.:Изд-во Томского университета.1990. 188 с.
 14. Пресмак А. С. Электромагнитная сигнализация в живой природе.М.: Советское радио.1974. 84 с.
 15. Сидякин В. Г. Влияние глобальных экологических факторов на нервную систему. Киев.:Наук.думка.1960.160 с.
 16. Судаков К. В. Модулированное электромагнитное поле как фактор избирательного действия на механизм целенаправленного поведения животных//Журн.высш. нервн. деятельн.1976.Т.26.вып.5.С.899-915.
 17. Темников Ф. В., Афонин В. И., Дмитриев В. И. Теоретические основы информационной техники. М.:Энергия.1971. 424 с.
 18. Тринчер К. С. Биология и информация. М.:Наука. 1964.100 с.
 19. Хакен Г. На пути к динамической теории информации//Термодинамика и регуляция биологических процессов. М.:Наука. 1984.С.57-64.
 20. Холодов Ю.А. Мозг в электромагнитных полях. М.:Наука. 1982.120с.
 21. Чижевский А.Л. Земное экзосолнечных бурь. М.:Мысль,1976.366с.
 22. Эйди У. Р. Частотные и энергетические окна при воздействии слабых электромагнитных полей на живую ткань//Тр. ин-та инженеров по электронике и радиотехнике. 1980.Т.68.№1.С.140-148.
 23. Delgado У. M. R. Biological effects of extremely low frequency electromagnetic fields//Biomagnetism. Application and Theory. Pergamon Press.1985.p.443-455.
 24. Vassilewsky N.N., Krupitsky E.N., Suvorov N.B. Elekt-romagnetic Treatment in Narcology// In: Abstracta of the US-USSR Workshop in Physical. Factors in the _ Environment. 1991. Midway.Utab. p.10-11.
 25. Serov S.A., Bankov V.I. Stimulation elektromiography application in the search of optimum parameters of magnetotherapy for patients with peripheral nerve injries//Constituent Congress International Society for Pathophysiology.1991.Moscow.p.68.

УДК 616.155.392.-07:577.21

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

РЕДКИЙ ВАРИАНТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ BCR-ABL ГЕНА, АССОЦИИРОВАННЫЙ С ФИЛАДЕЛЬФИЙСКОЙ ХРОМОСОМОЙ
Кафедра микробиологии, Межрегиональный детский онкогематологический центр

Наиболее агрессивные, плохо поддающиеся лечению варианты острого лимфобластного (ОЛЛ) и хронического миелобластного (ХМЛ) лейкозов наблюдаются при наличии в опухолевых клетках Tair называемой Филадельфийской хромосомы (Ph).

Филадельфийской хромосомой называется укороченная 22-я хромосома, которая образуется в результате реципроктной транслокации

t(9;22) (q34; q11). Разрыв 22-й хромосомы может происходить в различных участках гена BCR, а на 9-й хромосоме - в гене cABL. В результате транслокации на 22-й хромосоме образуется химерный ген BCR-ABL, а на 9-й хромосоме - химерный ген ABL-BCR [1]. Считается, что злокачественная трансформация клеток является следствием нарушения функции гена cABL, являющегося протонкогеном.

Ген cABL в норме расположен на длинном плече 9-й хромосомы в сегменте q34. Впервые он был описан в опухолевых клетках при Абельсоновской лейкемии мышей. Данный ген принимает участие в регуляции клеточного деления у животных. В виде онкогена этот ген содержится в геноме вируса Абельсоновской лейкемии мышей.

Ген ABL имеет длину 230 тыс. азотистых оснований и состоит из двенадцати экзонов. С 5'-конца расположены два экзона 1B и 1A, однако в результате альтернативного сплайсинга в матричной РНК содержатся последовательности только одного из указанных экзонов. В результате трансляции альтернативных форм мРНК образуются соответственно два вида cABL-белков: 1A и 1B формы cABL-протеинов. Обе названные формы белков обладают тирозинкиназной активностью [6].

В случае образования Ph хромосомы разрыв гена cABL чаще всего происходит в одной из нескольких возможных точек, локализующихся на участке между экзонами 1B и a2. В редких случаях разрыв гена cABL происходит на участке по направлению к 5'-концу от экзона 1B - при этом ген cABL переносится в 22-ю хромосому целиком [4]. Кроме этого, описана делеция экзона a2 при переносе гена ABL на 22-ю хромосому [5,7].

Ген BCR находится на длинном плече 22-й хромосомы в сегменте q11. Он имеет протяженность 130 тыс. пар оснований и состоит из 21 экзона. В этом гене известны большая (M-bcr) и малая (m-bcr) области кластеров точек разрыва. Кластер M-bcr локализуется в области, включающей экзона с 12-го по 16-й, которые также обозначаются как экзона с b1 по b5. Кластер m-bcr находится в первом интроне данного гена между экзонами e1 и e2 [1,6].

В результате транслокации t(9;22) на 22-й хромосоме могут образовываться различные варианты химерного BCR-ABL гена (табл.1).

Таблица 1

Варианты BCR-ABL транскриптов при t(9;22)

Локализация точки разрыва	Химерный транскрипт
M-bcr	p12a2 p13a2 p13a3* p14a2
m-bcr	e1a2

* Точка разрыва в гене cABL может находиться в участке протяженностью 200 тыс. пар оснований между экзонами 1B и a2, или в области 8,25 тыс. пар оснований в 5' направлении от начала экзона 1B. Однако в результате сплайсинга образуются транскрипты, в которых 3'-конец BCR соединен с экзоном a2, за исключением редких случаев делеции этого экзона.

Для Ph хромосомы, обнаруживаемой у взрослых больных ХМЛ, характерно наличие BCR-ABL гена с большой точкой разрыва. Данный вариант молекулярной перестройки встречается также в 50% случаев ОЛЛ у взрослых при наличии в опухолевых клетках Ph хромосомы. У

детей разрыв гена BCR в большой точке обнаруживается при относительно редко встречающемся "взрослом варианте" ХМЛ. Описаны также редкие случаи разрыва гена BCR в большой точке при остром нелимфобластном лейкозе (ОНЛ).

Разрыв гена BCR в малой точке описан у 50% взрослых больных ОЛЛ с Ph хромосомой, а также в 3-5% случаев ОЛЛ у детей [1].

В последние годы для диагностики транслокации t(9;22) наряду с традиционным цитогенетическим методом дифференциальной окраски хромосом все большее распространение получает современный высоко-чувствительный метод - полимеразная цепная реакция (ПЦР) - ПЦР позволяет амплифицировать участок химерного гена BCR-ABL, характерный для опухолевых клеток, несущих Ph хромосому. Обычно используют метод "гнездной" ПЦР, при которой сначала амплифицируют более крупный участок кДНК, содержащий стык между генами BCR и cABL, используя внешние праймеры, а затем продукт первой ПЦР используют как матрицу для ПЦР-2, внося в реакционную смесь внутренние праймеры, с помощью которых амплифицируют более короткий участок ДНК, содержащий стык генов BCR и ABL [2,3,7].

Для обнаружения Ph хромосомы, имеющей разрыв гена BCR в области M-bcr, обычно используют пару праймеров, которые локализуются в экзоне b2. Для индикации разрыва гена BCR в малой точке берутся праймеры, комплементарные участку экзона e1. Нижняя пара праймеров, ограничивающих транскрипцию с 3'-конца химерного BCR-ABL гена, комплементарна участкам экзона a3 гена ABL. Такая комбинация праймеров обеспечивает индикацию подавляющего числа вариантов транслокации t(9;22) как у взрослых, так и у детей, больных ХМЛ и ОЛЛ.

В настоящей работе описан редкий вариант транслокации t(9;22) у пациента, больного ХМЛ, при которой с помощью обычной "гнездной" ПЦР не удавалось обнаружить химерных BCR-ABL транскриптов.

Фракцию лейкоцитов из костного мозга пациентов отделяли путем центрифугирования в градиенте плотности с использованием Лимфодекса (Fresenius), замораживали в жидком азоте и хранили при -20° С.

Суммарную мРНК из клеток выделяли с помощью раствора RNeasy (Qiagen/Biotecx) и изопропанола.

Обратную транскрипцию и ПЦР проводили с использованием набора GenAmp RNA PCR Kit (Perkin Elmer). Полученную после обратной транскрипции кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР-1 с внешними праймерами, указанными в табл. 2.

Таблица 2
Праймеры, использованные в ПЦР

Номер праймера	Ген	Позиция в м-РНК	Последовательность нуклеотидов
66 наруж.	abl	491-514	CCA GAC TGT TGA CTG GCG TGA TGT
64 внутр.	abl	427-450	TTC ACA CCA TTC CCC ATT GTG ATT
63 внутр.	abl	272-295	TGA GTG AAG CCG CTC GTT GGA ACT
67 наруж.	abl	247-264	CCA GTA GCA TCT GAC TTT GAG CCT
69 внутр.	bcr (M)	3193-3217	AGA AGT GTT TCA GAA GCT TCT CCT
65 наруж.	bcr (M)	3142-3165	CCT CTG ACT ATG AGC GTG CAG AGT
160 внутр.	bcr (m)	1846-1869	ATG ACG AGG GCG CCT TCC ATG GAG
241 наруж.	bcr (m)	1719-1742	CAA CAG TCC TTC GAC AGC AGC AGT

В ПЦР-1 проводили 35 циклов амплификации при следующих температурных режимах и экспозиции: денатурация - 94 С, 15 сек; отжиг праймеров-64 С. 45 сек, удлинение цепи-72 С, 45 сек. Продукт ПЦР-1 использовали в качестве матрицы для ПЦР-2 с внутренними праймерами. Количество циклов амплификации в ПЦР-2 равнялось 25, температурные режимы и экспозиции те же, что и в ПЦР-1.

В качестве положительного контроля разрыва в М-bcr использовали кДНК культуры клеток К-562, а для разрыва в m-bcr - кДНК из клеток Sup B15.

Обратную транскрипцию и ПЦР проводили в амплификаторе Perkin Elmer 9G00. Продукт ПЦР-2 исследовали с помощью электрофореза в 2,5 % агарозном геле (Sigma) с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия и фотографированием геля на ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Идентификацию полос ЛНК в геле осуществляли с помощью набора маркерных ДНК (Boehringer).

Цитогенетический анализ проводили по общепринятой методике культивирования клеток костного мозга с последующей дифференциальной G-окраской хромосом.

Результаты исследования в ПЦР 102 пациентов Межрегионального детского онкогематологического центра с различными формами лейкозов на наличие транслокации t(9;22) представлены в табл.3

Таблица 3
Диагностика t(9;22) с помощью ПЦР у пациентов Межрегионального детского онкогематологического центра

Диагноз	Всего обследовано	BCR-ABL	M-bcr	m-bcr	Ph "+" * BCR-ABL "--"
ОЛЛ первичный	41	2	1	1	0
ОЛЛ ремиссия	17	0	0	0	0
ОЛЛ рецидив	14	1	0	1	0
НХЛ**	4	0	0	0	0
ОНЛ	10	0	0	0	0
ХМЛ	8	3	2	0	1
Другие	8	0	0	0	0
Всего	102	6	3	2	1

* Ph обнаружена цитогенетическим методом; результат ПЦР отрицательный;

** Неходжкинская лимфома.

Ph хромосома с малой точкой разрыва в гене BCR была обнаружена у двух пациентов с ОЛЛ. Разрыв гена BCR в области большого кластера обнаружен у двух больных ХМЛ.

У одного пациента с ХМЛ (больной Р.) при цитогенетическом исследовании была выявлена типичная Ph хромосома. Однако при исследовании материала от данного больного при проведении обычной "гнездой" ПЦР с указанными праймерами не удалось обнаружить BCR-ABL транскриптов, имеющих большую или малую точку разрыва в гене BCR. Описания подобного случая в литературе нами не обнаружено.

Логично было предположить наличие иной, неописанной точки разрыва в гене BCR или в гене ABL, либо отсутствие экспрессии химерного BCR-ABL гена в опухолевых клетках. Другой причиной полученного отрицательного результата "гнездой" ПЦР могла быть делеция второго экзона в гене ABL, описанная как редко встречающаяся форма BCR- ABL-транскриптов, либо делеция последовательности нуклеотидов в экзонах, соответствующих локализации используемых праймеров. Последняя гипотеза была проверена нами в эксперименте.

Видоизмененный вариант «гнездной» ПЦР позволяет обнаруживать делецию при использовании определенных комбинаций праймеров, позволяющих получать транскрипты разной длины, начиная с какой-либо исходной точки.

За исходные точки были приняты: позиция 3193 (праймер 69, экзон b2) и позиция 1846 (праймер 160, экзон e1) в гене BCR. Комбинация указанных праймеров с праймерами, комплементарными гену ABL в его втором (63 и 67) и третьем (64 и 66) экзонах, позволяла получить транскрипты определенной длины только в случае отсутствия делеции в участке локализации того или иного праймера (таблица 4). О наличии делеции в гене ABL, таким образом, можно было судить по отсутствию транскрипта при той или иной комбинации праймеров.

При исследовании в ПЦР с различными комбинациями праймеров кДНК пациента Р. параллельно с контрольными образцами, имеющими разрывы гена BCR в большой и малой точках соответственно, было обнаружено, что в кДНК пациента отсутствует область гена ABL соответствующая локализации праймера 64 (позиция 427-450), и в то же время обнаруживается химерный BCR-ABL транскрипт при комбинации праймеров 69 плюс 66. Длина данного транскрипта оказалась меньше таковой у контрольной клеточной культуры К 562, а именно около 350 оснований вместо 398.

Таблица 4
Длина транскриптов, образуемых при амплификации участков BCR-ABL мРНК с различной комбинацией праймеров

Точка разрыва в гене BCR	Комбинация праймеров		Число пар оснований в транскрипте после ПЦР-2
	ПЦР-1	ПЦР-2	
М	65+67	69+67	148
М	65+63	69+63	179
М	65+64	69+64	334
М	65+66	69+66	398
m	241+67	160+67	68
m	241+63	160+63	99
m	241+64	160+64	254
m	241+66	160+66	318

Полученный результат позволяет сделать вывод о том, что у пациента Р. обнаружен ранее не описанный вариант транслокации t(9;22) с большой точкой разрыва в гене BCR и делецией в экзоне a3 гена ABL. Для точной локализации делеции и определения последовательности deletированного участка необходимо секвенирование данной области химерного гена BCR-ABL.

Таким образом, характер перестройки генов BCR и ABL при транслокации t(9;22) отличается разнообразием и не ограничивается описанными в литературе вариантами, что представляет значительный интерес как для изучения образования химерного BCR-ABL гена, так и для молекулярной диагностики Ph+ лейкозов.

Авторы выражают искреннюю благодарность научному руководителю работы профессору Ф.Ламперту, директору детской клиники Гиссенского университета, руководителю референс-лаборатории цитогенетики протокольной группы ВФМ, г.Гиссен, Германия, за большой вклад в создании лаборатории молекулярной генетики Детского онко-гематологического центра г. Екатеринбург.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roland Berger, Sai Juan Chen and Zhu Chen. Philadelphia-positive Acute Leukemia. Cytogenetic and molecular Aspects Cancer Genet. Cytogenet. 1990; 44: 143-152.
2. Elaine Mackenzie. Evelyn Stewart, G.D. Birnie. ABL-BCR mRNA's Transcribed from Chromosome 9q+ in Ph+ CML. Leukemia 1993; 7: 702 - 706.
3. Maurer J., Jassen JVG, Thiel E., Van Lenderen J., Ludwig WD, Aydemiz U., Heinze B., Fonatsch C., Harbott J., Reiter A., Reihm H., Hoelzer D., Bartrom C.R. Detection of chimeric BCR-ABL genes in ALL by PCR. Lancet 1991; 337: 1055-1058.
4. Christine M. Morris, Nora Heisterkamp, John Groffen, Peter H. Fitzgerald. Entire ABL gene is joined with 5'-BCR in some patients with Philadelphia-positive Leukemia. Blood 1991; 78: 1078-1084.
5. van der Plas DC, Soekarman D, van Gent AM, Grosveld G., Hagemeyer A. BCR-ABL mRNA lacking abl exon A2 detected by PCR in a CML patient. Leukemia 1991; 5: 457-461.
6. Lalita Ramakrishnan, Naomi Rosenberg, abl-genes. Biochimica et Biophysica Acta 989 (1989): 209-224.
7. Tuszynski A., S. Dhut, B.D. Young, T.A. Lister, A.Z. Rohatiner, J.A.L. Amess, T. Chaplin, E. Dorey, B. Gibbons. Detection and significance of bcr-abl mRNA transcripts and Fusion Proteins in Ph+ Adult ALL. Leukemia 1993; 7: 1504-1508.

УДК 616.1

Г.А.Спирина, М.В. Галочкина

АРХИТЕКТОНИКА МИОКАРДА И ПРОВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ СЕРДЦА
ЧЕЛОВЕКА ПРИ СИНДРОМЕ ДАУНА
Кафедра анатомии человека

Патологические изменения строения сердца нередко возникают при генетических заболеваниях человека. При синдроме Дауна нарушения деятельности сердечно-сосудистой системы являются частым симптомом и представляют собой одно из проявлений самого заболевания [7].

Сведения о частоте встречаемости заболеваний сердца у больных с синдромом Дауна в современной научной литературе достаточно противоречивы. Клинически врожденные пороки сердца у детей с синдромом Дауна выявляются в 20-63% случаев [8]. На секционном материале врожденные пороки сердца и крупных сосудов встречаются в 45-73% наблюдений. Каждый четвертый порок сердца сочетается с аномалиями других органов и систем [1, 6].

Малоизученной остается группа больных с синдромом Дауна при формировании сердца без врожденного порока. Целью настоящего исследования является выявление закономерностей строения предсердно-желудочкового отдела проводящей системы сердца, изучение тканевой организации и стереологических параметров миокарда новорожденных и детей с синдромом Дауна при сформированном сердце без порока.

Материалом для исследования послужили 20 препаратов сердец новорожденных и детей с синдромом Дауна (СД) в возрасте до 13 лет при формировании сердца без врожденного порока. Причиной их смерти явились травмы, несовместимые с жизнью, острая кишечная инфекция. Указания на заболевания сердечно-сосудистой системы по данным патологоанатомического вскрытия не обнаружено.