

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Дорошенко, Е. М.* Методологические аспекты и трудности анализа свободных (физиологических) аминокислот и родственных соединений в биологических жидкостях и тканях / Е. М. Дорошенко // Сборник тезисов Республиканской научной конференции по аналитической химии с международным участием «Аналитика РБ-2010». — Минск, 2010. — С. 126.
2. *Лях, И. В.* Влияние совместного и раздельного хронического введения свинца и динила на уровень катехоламинов в мозге крыс: возможность коррекции нарушений препаратом «таудинк» / И. В. Лях // Тезисы докладов конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора И. П. Протасевича 15–16 апреля 2010 г. / ГрГМУ; редкол.: П. В. Гарелик [и др.]. — Гродно, 2010. — С. 264.
3. *Лях, И. В.* Влияние хронического и острого воздействия динилом на уровень биогенных аминов в мозге крыс / И. В. Лях // Наука - 2010: сб. науч. ст. В 2 ч. Ч. 2 / ГрГУ им. Я. Купалы; редкол.: А. Ф. Проневич [и др.]. — Гродно, 2010. — Ч. 2. — С. 17–19.
4. *Лях, И. В.* Влияние внутрижелудочного поступления динила и свинца на концентрации свободных аминокислот в гипоталамусе крысят / И. В. Лях, Е. М. Дорошенко, В. Ю. Смирнов // Проблемы здоровья и экологии. — 2011. — № 3(29). — С. 127–132.
5. *Лях, И. В.* Изменение уровней биогенных аминов в среднем мозге и стриатуме крыс при острой интоксикации динилом / И. В. Лях // НИРС - 2010: сб. науч. раб. студ. Респ. Беларусь / БГУ; редкол.: С. В. Абламейко [и др.]. — Минск, 2011. — С. 69.
6. *Лях, И. В.* Изменение уровней индоламинов в мозге крыс при совместном и раздельном введении свинца и динила: возможность коррекции нарушений препаратом «таудинк» / И. В. Лях // Тезисы докладов конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора И. П. Протасевича 15–16 апреля 2010 г. / ГрГМУ; редкол.: П. В. Гарелик [и др.]. — Гродно, 2010. — С. 265.
7. Acute reduction of brain serotonin and 5-HIAA following food consumption: correlation with the ratio of serum tryptophan to the sum of competing neutral amino acids / D. Fernstromj [et al.] // J. Neural. Transm. — 1975. — Vol. 36, № 113. — P. 121.
8. *Flora, S. J.* Combined administration of taurine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in the treatment of chronic lead intoxication in rats / S. J. Flora, M. Pande, S. Bhadauria // Hum. Exp. Toxicol. — 2004. — Vol. 23, № 4. — P. 157–166.
9. *Fortune, T.* Chronic low-level lead exposure affects the monoaminergic system in the mouse superior olivary complex / T. Fortune, D. I. Lurie // J. Comp. Neurol. — 2009. — Vol. 513, № 5. — P. 542–558.
10. *Gedeon, Y.* Changes in mesocorticolimbic DOPamine and D1/D2 receptor levels after low level lead exposure: a time course study / Y. Gedeon, G. T. Ramesh, P. J. Wellman // Toxicol. Lett. — 2001. — Vol. 15, № 123(2–3). — P. 217–226.
11. *Montgomery, A. J.* Reduction of brain dopamine concentration with dietary tyrosine plus phenylalanine depletion: an [11C] raclopride PET study / A. J. Montgomery, S. F. Mc Tavish, P. J. Cowen // Am. J. Psychiatry. — 2003. — Vol. 160, № 10. — P. 1887–1889.
12. *Sansar, W.* Effects of chronic lead intoxication on rat serotonergic system and anxiety behavior / W. Sansar, M. M. Bouyatas, S. Ahboucha // Acta Histochem. — 2012. — Vol. 114, № 1. — P. 41–45.
13. *Saxena, G.* Changes in brain biogenic amines and haem biosynthesis and their response to combined administration of succimers and Centella asiatica in lead poisoned rats / G. Saxena, S. J. Flora // J. Pharm. Pharmacol. — 2006. — Vol. 58, № 4. — P. 547–559.
14. *Shan-Shan, Yu.* Influences of different developmental periods of taurine supplements on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area of rats following prenatal and perinatal lead exposure / Yu Shan-Shan // BMC Developmental Biology. — 2007. — Vol. 7. — P. 51.
15. *Zhu, D. M.* Protection by a taurinesupplemented diet from lead-induced deficits of long-term potentiation/depotentialiation in dentate gyrus of rats in vivo / D. M. Zhu, M. Wang, J. Q. She // Neuroscience. — 2005. — Vol. 134, № 1. — P. 215–224.

Поступила 15.07.2013

УДК 616-006.446-053.8:[575.224.22+575.224.23]-036

### АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ГЕНОВ СЕВРА, NPM1, FLT3 И P53 В ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ С МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И ОСТРЫМ НЕЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

**А. Е. Силин, В. Н. Мартинков, Д. К. Новик, Ж. М. Козич, И. Б. Тропашко,  
В. К. Шпудейко, А. А. Силина, А. В. Воропаева, С. М. Мартыненко**

**Республиканский научно-практический центр  
радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель**

В группе, состоящей из 23 пациентов с миелодиспластическим синдромом МДС (вариант — рефрактерная анемия с избытком бластов, РАИБ) и 97 пациентов с острым нелимфобластным лейкозом (ОНЛЛ) проведен молекулярно-генетический анализ распространенности соматических мутаций генов FLT3, NPM1, СЕВРА и p53.

Установлено, что мутации FLT3-ITD в группе пациентов с МДС РАИБ встречаются с частотой 8,7 ± 5,9 %, а в группе с ОНЛЛ — 22,7 ± 4,3 %. Мутация FLT3 D835 выявлена только в группе ОНЛЛ с частотой 7,2 ± 2,6 %.

Мутации гена NPM1 выявлены в 8,7 ± 5,9 % случаев МДС РАИБ и 21,6 ± 4,2 % случаев ОНЛЛ.

Соматические мутации СЕВРА обнаружены в 11,3 ± 3,2 % случаев ОНЛЛ, а в группе МДС РАИБ отсутствовали. Мутации гена p53 выявлены в 17,4 ± 7,9 % случаев МДС РАИБ и 10,3 ± 0,3 % случаев ОНЛЛ.

Посредством прямого секвенирования дана характеристика всем выявленным мутациям генов СЕВРА и p53.

В результате проведенного анализа установлено, что использование молекулярно-генетических маркеров совместно с цитогенетическими позволяет расширить группу с прогностическими маркерами на 41,3 % по сравнению с использованием только цитогенетических данных.

**Ключевые слова:** миелодиспластический синдром, острый нелимфобластный лейкоз, мутации генов, FLT3, NPM1, СЕВРА, p53.

### THE ANALYSIS OF СЕВРА, NPM1, FLT3 AND P53 GENE MUTATIONS IN GROUPS OF PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME AND ACUTE NONLYMPHOCYTIC LEUKAEMIA

**A. E. Silin, V. N. Martinkov, D. K. Novik, Zh. M. Kozich, I. B. Tropashko,  
V. K. Shpudeyko, A. A. Silina, A. V. Voropayeva, S. M. Martynenko**

**Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel**

The article presents the molecular genetic analysis of the prevalence of somatic mutations in FLT3, NPM1, СЕВРА, and p53 genes in a group consisting of 23 patients with myelodysplastic syndrome MDS (option — refractory anemia with excess blasts, RAEB) and 97 patients with acute nonlymphoblastic leukemia (ANLL).

It was ascertained that FLT3-ITD mutations in the group of patients with MDS RAEB occur with the prevalence of  $8,7 \pm 5,9$  %, while in the group with ANLL they are observed in  $22,7 \pm 4,3$  % cases. FLT3 D835 mutations were detected only in the ANLL group with the prevalence of  $7,2 \pm 2,6$  %. NPM1 gene mutations were detected in  $8,7 \pm 5,9$  % of MDS RAEB cases and in  $21,6 \pm 4,2$  % of ANLL cases.

CEBPA somatic mutations were found in  $11,3 \pm 3,2$  % of ANLL cases, while the group of MDS RAEB was free of them. Mutations in the p53 gene were detected in  $17,4 \pm 7,9$  % of MDS RAEB cases and in  $10,3 \pm 0,3$  % of ANLL cases.

All the detected CEBPA and p53 gene mutations were described by means of direct sequencing.

The analysis results show that the use of molecular genetic markers in combination with cytogenetic ones makes it possible to expand the group with prognostic markers by 41,3 % in comparison with the use of only cytogenetic data.

**Key words:** myelodysplastic syndrome, acute nonlymphoblastic leukemia, gene mutation, FLT3, NPM1, CEBPA, p53.

### **Введение**

Важной составляющей лечения острых нелимфобластных лейкозов (ОНЛЛ) является своевременный прогноз заболевания и оценка на каждом из этапов лечения эффективности проводимой терапии. Для этих целей в качестве маркеров используются различные хромосомные aberrации. В то же время более половины случаев ОНЛЛ составляют больные с нормальным кариотипом, которые относятся к подгруппе с промежуточным прогнозом. Проведенные исследования показывают, что фенотипически данная группа является гетерогенной и может быть разделена на прогностически различные подгруппы. Таким образом, расширение спектра прогностических маркеров и маркеров, которые позволили бы оценивать эффективность лечения, является актуальным, особенно в группе пациентов без видимых хромосомных aberrаций.

В настоящее время особое внимание уделяется поиску молекулярно-генетических маркеров при ОНЛЛ. По данным различных исследований, ОНЛЛ часто сопровождается соматическими мутациями ряда генов. К их числу относятся ген FLT3, мутации которого (FLT3-ITD и FLT3 D835), по литературным данным, определяют неблагоприятный прогноз [1-5], ген NPM1 (мутации определяют благоприятный прогноз, кроме случаев сочетания с мутациями FLT3) [5-7], ген CEBPA (благоприятный прогноз) [8-10] и ген p53 (неблагоприятный прогноз) [11-12].

### **Цель**

Анализ вклада мутаций генов FLT3, NPM1, CEBPA и p53 в формирование оценки прогноза заболевания у пациентов с миелодиспластическим синдромом МДС (вариант — рефрактерная анемия с избытком бластов, РАИБ) и ОНЛЛ.

### **Материалы и методы**

Материал для проведения молекулярно-генетического анализа был собран в виде образцов цельной венозной крови и костного мозга у 120 пациентов, проходивших лечение в период 2009–2013 гг. в гематологическом отделении для взрослых ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ». В зависимости от диагноза данные пациенты разделены на 2 группы — группа с МДС РАИБ и группа с ОНЛЛ. Диагноз выставлялся по

клинической информации при первичном поступлении пациента вне зависимости от возможного последующего трансформирования МДС в ОНЛЛ. Группа пациентов с МДС насчитывала 23 человека: 14 мужчин и 9 женщин. Средний возраст в данной группе составил 58,0 года. Группа с ОНЛЛ сформирована из 97 пациентов, из них 38 мужчин и 59 женщин. Средний возраст — 54,0 года.

По классификации FAB, группа исследования из числа пациентов с ОНЛЛ подразделялась на 5 подгрупп (M0-M4). В подгруппу с M0 (острый ранний миелобластный лейкоз) входили 7 пациентов: 3 мужчин и 4 женщины, средний возраст — 50,7 года. Подгруппа с M1 (острый миелобластный лейкоз) состояла из 29 пациентов: 17 мужчин и 12 женщин, средний возраст — 58,6 года. Подгруппа с M2 (острый миелобластный лейкоз с частичным созреванием) насчитывает 25 пациентов: 4 мужчин и 21 женщину, средний возраст — 55,6 года. Подгруппа M3 (острый промиелоцитарный лейкоз) состояла из 23 пациентов, из них 9 мужчин и 14 женщин, средний возраст — 46,0 года. Подгруппа с M4 (острый миеломонобластный лейкоз) насчитывала 13 пациентов: 5 мужчин и 8 женщин, средний возраст — 56,5 года.

Образцы ДНК из крови и костного мозга выделялись стандартным SDS-методом.

Мутации FLT-ITD и NPM1, представляющие собой крупные дупликации, анализировали методом ПЦР со специфическими праймерами, фланкирующими 14–15 экзонами гена FLT3 и 11 интрон-12 экзон гена NPM1 с последующей электрофоретической детекцией в 2,7 % агарозном геле с окраской бромистым этидием. Мутацию FLT3 D835 анализировали посредством метода RFLP-PCR с рестриктазой EcoRV. Мутации гена CEBPA выявляли методом SSCP-PCR в пределах всей кодирующей последовательности гена посредством 12 % неденатурирующего полиакриламидного гелеэлектрофореза с окраской серебром. Таким же методом анализировали мутации гена p53 в пределах 5–9 экзонов. Для идентификации мутаций генов CEBPA и p53 проводили секвенирование с прямым и обратным праймерами посредством генетического анализатора AB3500.

**Результаты и обсуждение**

Молекулярно-генетический анализ мутаций генов FLT3 и NPM1 проводили с использованием ДНК, выделенной как из цельной венозной крови, так и из костного мозга. В результате проведенного молекулярно-генетического анализа 14-15-го и 20-го экзонов гена FLT3 и 12-го экзона гена NPM1 в группе пациентов с МДС РАИБ было выявлено 2 случая присутствия как в костном мозге, так и в образцах крови соматической мутации FLT3-ITD. Частота данной мутации в группе составила  $8,7 \pm 5,9 \%$ .

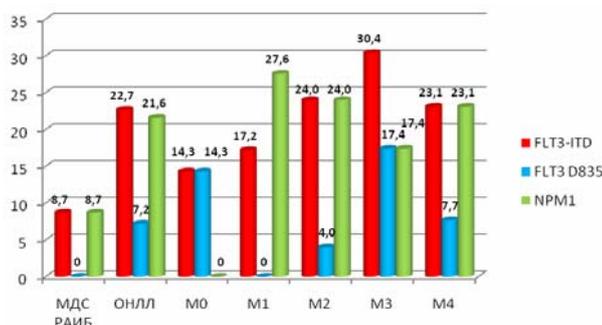
Как было сказано выше, постановка диагноза пациентам и, как следствие, распределение их по группам исследования осуществлялись на основании клинической информации, полученной при первичном поступлении. В этой связи следует отметить, что у пациентов с выявленными случаями мутации FLT3-ITD, которых при первичном диагнозе включены в группу МДС РАИБ, че-

рез короткий промежуток времени произошла трансформация в ОНЛЛ М4.

Также в группе МДС РАИБ были выявлены 2 случая мутации NPM1 ( $8,7 \pm 5,9 \%$ ). Примечательно, что в 1 случае мутация выявлена только в образце крови.

В группе пациентов с ОНЛЛ было выявлено 50 случаев наличия в крови и (или) в костном мозге различных мутаций из числа анализируемых: в 22 случаях ( $22,7 \pm 4,3 \%$ ) — мутация FLT-ITD, у 21 пациента ( $21,6 \pm 4,2 \%$ ) — мутация гена NPM1, в клиническом материале 7 пациентов ( $7,2 \pm 2,6 \%$ ) — мутация D835 гена FLT3.

Наблюдались различия в составе и частоте встречаемости анализируемых мутаций в различных подгруппах пациентов с ОНЛЛ. Наглядное изображение распространенности анализируемых мутаций в группах и подгруппах исследований представлено на рисунке 1.



**Рисунок 1 — Распространенность мутаций генов FLT3-ITD и NPM1 в исследуемых группах и подгруппах пациентов с МДС РАИБ и ОНЛЛ**

В подгруппе пациентов с M0 по FAB классификации выявлены по 1 случаю присутствия мутаций FLT-ITD ( $14,3 \pm 13,2 \%$ ) и D835 гена FLT3 ( $14,3 \pm 13,2 \%$ ). При этом данные мутации выявлены совместно у 1 пациента. Однако следует учитывать немногочисленность данной подгруппы, что может повлиять на точность оценки распространенности как выявленных мутаций, так и отсутствующих на данном этапе исследования.

Среди 29 пациентов, входящих в подгруппу M1, было выявлено 13 различных мутаций. У 5 пациентов ( $17,2 \pm 7,0 \%$ ) определена мутация FLT3-ITD, а в 8 случаях ( $27,6 \pm 8,3 \%$ ) — NPM1. Следует отметить, что данная подгруппа оказалась наиболее насыщенной мутациями гена NPM1. При этом в большинстве случаев мутация FLT3-ITD сочеталась с мутациями NPM1. Мутация FLT3 D835 у пациентов из данной подгруппы отсутствовала.

В пределах подгруппы M2, насчитывающей 25 пациентов, выявлены 13 случаев мутаций. В 6 случаях ( $24,0 \pm 8,5 \%$ ) присутствовала мутация FLT3-ITD, еще в 6 случаях ( $24,0 \pm 8,5 \%$ ) —

мутация гена NPM1. При этом в 3 случаях эта мутация сочеталась с FLT3-ITD. Мутация FLT3 D835 в данной подгруппе выявлена у 1 пациента ( $4,0 \pm 3,9 \%$ ) и присутствовала только в образце крови.

Среди 23 случаев острого промиелоцитарного лейкоза (M3) выявлены все типы анализируемых мутаций. Эта подгруппа оказалась одной из наиболее насыщенной мутациями FLT3-ITD, которые присутствовали в  $30,4 \pm 9,6 \%$  случаев данного типа лейкоза. У 4 пациентов ( $17,4 \pm 7,9 \%$ ) выявлена мутация гена NPM1, которая в 1 случае сочеталась с FLT3-ITD. В 4 случаях ( $17,4 \pm 7,9 \%$ ) присутствовала мутация FLT3 D835, которая в 2 случаях сочеталась с мутацией FLT3-ITD, а в 1 — с NPM1.

В подгруппе пациентов с M4, состоящей из 13 пациентов, как и в предыдущей подгруппе, выявлены все три типа анализируемых мутаций. У 3 пациентов ( $23,1 \pm 11,7 \%$ ) была выявлена мутация FLT3-ITD. В 3 случаях выявлена мутация NPM1 ( $23,1 \pm 11,7 \%$ ), которая в 1 случае сочеталась с мутацией FLT3-ITD. В 1 случае ( $7,7 \pm 7,4 \%$ ) была выявлена мутация FLT3 D835.

Таким образом, в результате проведенного молекулярно-генетического анализа была описана частота встречаемости трех типов мутаций генов FLT3 и NPM1 в исследуемых группах сравнения. В качестве особенностей распространенности анализируемых мутаций в группе пациентов с ОНЛЛ следует отметить совместное проявление мутаций FLT3-ITD и NPM1, которое наблюдалось у более половины мутантных случаев. Часть мутаций выявлялась только в каком-либо одном образце клинического материала, что требует при проведении анализа использовать в качестве источника ДНК как костный мозг, так и кровь.

Молекулярно-генетический анализ мутаций гена СЕВРА проводили с использованием образцов ДНК, выделенных из костного мозга. В ходе проведенного SSCP-анализа в целом были выявлены 18 случаев отличающихся электрофоретических паттернов. Однако прямое секвенирование фрагментов ДНК подтвердило только 14 случаев присутствия в образцах соматических мутаций гена СЕВРА. Характеристика выявленных мутаций представлена в таблице 1.

Как видно из данных таблицы, у 3 пациентов были выявлены по 2 мутации, локализованные в различных анализируемых фрагментах. Во всех этих случаях одна из мутаций была локализована в 4-м фрагменте, а вторая мутация выявлена либо в 1-м (AML21 и AML75), либо во 2-м фрагменте (AML51). Двойные му-

тации являются известной особенностью гена СЕВРА при ОНЛЛ и ранее описаны в литературных источниках [9, 10].

В подавляющем большинстве случаев у пациентов выявлены мутации в виде инсерций или делеций, при этом изменения отмечались относительно крупные — от 3-х до 18-ти пар нуклеотидов (таблца 1). Также выявлены четыре случая однонуклеотидных замен. При этом в 3 случаях мутация представляла собой синонимическую замену g.5512G>A, что предположительно не может привести к клинически значимому эффекту. В 1 случае присутствовала несинонимическая замена g.6027G > C, приводящая к изменению кодирующей последовательности p.Arg306Pro.

Распределение выявленных мутаций по группам и подгруппам исследования было неравномерным. На рисунке 2 в процентном соотношении представлена встречаемость мутаций СЕВРА в различных подгруппах исследования. Расчеты произведены по количеству пациентов с мутациями (11 случаев) без учета случаев двойных мутаций.

Интересно отметить, что в относительно большой группе пациентов с МДС РАИБ не было выявлено ни одного случая мутаций СЕВРА. Также мутации отсутствовали в подгруппе ОНЛЛ М0. Однако это может быть связано с небольшим количеством пациентов, входящих в данную подгруппу.

Таблица 1 — Характеристика мутаций, выявленных в результате молекулярно-генетического анализа гена СЕВРА

№	Образец	FAB	Фрагмент	Тип изменения	Genomic description NG 012022.1:	Coding description NM 004364.3:	AA change
1	AML009	M4	3	In-frame coding	g.5696-5697insCGCACC	c.586-587insCGCACC	p.Pro196_Pro197insProHis
2	AML021	M2	1	Frameshift coding	g.5287-5288insG	c.177-178insG	p.Thr60Aspfs47
3	AML021	M2	4	In-frame coding	g.6038-6039ins18	c.928-929ins18	p.Thr310LisGlnArgAsnValGluThr
4	AML051	M1	2	Frameshift coding	g.5374-5381del8	c.264-271del8	p.Gln88HisfsX16
5	AML051	M1	4	Non-synonymous coding	g.6027G>C	c.917G>C	p.Arg306Pro
6	AML052	M1	2	Synonymous coding	g.5512G>A	c.402G>A	p.Ala134=
7	AML058	M4	2	Synonymous coding	g.5512G>A	c.402G>A	p.Ala134=
8	AML062	M1	2	Synonymous coding	g.5512G>A	c.402G>A	p.Ala134=
9	AML068	M2	2	Frameshift coding	g.5479-5479insG	c.368-369insG	p.Gly123GlyfsX46
10	AML073	M3	3	In-frame coding	g.5696-5697insCGCACC	c.586-587insCGCACC	p.Pro196_Pro197insProHis
11	AML075	M2	1	Frameshift coding	g.5213delC	c.103delC	p.Arg35GlyfsX123
12	AML075	M2	4	In-frame coding	g.6049-6050insAAG	c.939-940insAAG	p.Lys313_Val314insLys
13	AML091	M2	3	In-frame coding	g.5696-5697insCGCACC	c.586-587insCGCACC	p.Pro196_Pro197insProHis
14	AML095	M2	4	In-frame coding	g.6049-6050insAAG	c.939-940insAAG	p.Lys313_Val314insLys

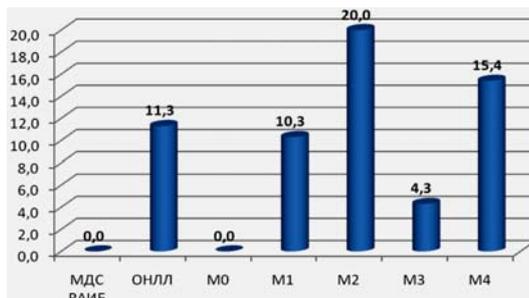


Рисунок 2 — Распределение мутаций гена СЕВРА по группам и подгруппам исследования

В целом в группе пациентов с ОНЛЛ мутации СЕВРА присутствовали в  $11,3 \pm 3,2$  % случаев (11 пациентов из 97 обследованных). В относительно многочисленной подгруппе М1 (29 пациентов) было выявлено 3 пациента с мутациями СЕВРА ( $10,3 \pm 5,6$  %). В подгруппе ОНЛЛ вариант М2 (25 пациентов) было выявлено 5 случаев различных мутаций ( $20,0 \pm 8,0$  %). При этом у 2 пациентов из этой подгруппы были выявлены по 2 мутации. В подгруппе М3, насчитывающей 23 пациента, выявлена только 1 мутация ( $4,3 \pm 4,2$  %), в то время как в относительно небольшой подгруппе М4, насчитывающей 13 пациентов, было выявлено 2 случая мутаций СЕВРА ( $15,4 \pm 1,1$  %).

В ходе проведенного анализа ДНК, выделенной из костного мозга 120 пациентов из

различных подгрупп исследования, по результатам предварительного SSCP-PCR анализа с последующим секвенированием выявлены 17 случаев наличия соматических мутаций гена p53, локализованных в пределах 5–9 экзонов. При этом у 3 пациентов были выявлены одновременно по две различные мутации. Таким образом, среди 120 исследованных пациентов у 14 присутствовали в костном мозге различные соматические мутации p53. Характеристика выявленных мутаций представлена в таблице 2.

Из 14 пациентов с мутациями 4 человека были с диагнозом МДС РАИБ ( $17,4 \pm 7,9$  % в группе с МДС). Однако следует отметить, что одна из выявленных мутаций была локализована в 8-м интроне (таблица 2) и, по всей видимости, не имеет клинического эффекта.

Таблица 2 — Характеристика выявленных соматических мутаций гена p53 в костном мозге пациентов из исследуемых групп

№	Образец	FAB	Экзон	Тип изменения	Genomic description NG_017013.2	Coding description CCDS11118.1 NM_000546.5	AA change
1	AML06	M1	intron 9	Intronic	g.14028T>C	c.993+12T>C	—
2	AML17	МДС	exon 7	Frameshift coding	g.13274-13275delGT	c.686-687delGT c.686-687del2b	p.Cys229TyrfsX9
3	AML19	МДС	intron 8	Essential splice site	g.13851G>A	c.919+1G>A	—
4	AML27	M4	exon 7	Non-synonymous coding	g.13303A>G	c.715A>G	p.Asn239Asp
5			exon 8	Frameshift coding	g.13718- 13723AATCTA>G	c.787-792AATCTA>G c.787-792delAATCTAinsG	p.Asn263-Leu264AlafsX6
6	AML28	МДС	exon 7	In-frame coding	g.13304-13324del21	c.716-736del21	p.Asn239-Gly245del
7	AML32	M0	exon 6	Non-synonymous coding	g.12597C>T	c.577C>T	p.His193Tyr
8	AML35	M2	exon 8	Non-synonymous coding	g.13749G>A	c.818G>A	p.Arg273His
9	AML48	МДС	exon 5	Non-synonymous coding	g.12394C>T	c.455C>T	p.Pro152Leu
10	AML55	M1	exon 6	Non-synonymous coding	g.12679A>G	c.659A>G	p.Tyr220Cys
11			exon 6	Synonymous coding	g.12692G>A	c.672G>A	p.Glu224Glu
12	AML57	M1	exon 6	Frameshift coding	g.12634insA	c.614insT	p.Tyr205LeufsX3
13	AML63	M4	exon 7	Non-synonymous coding	g.13331G>A	c.743G>A	p.Arg248Gln
14	AML71	M1	exon 7	Non-synonymous coding	g.13289A>G	c.701A>G	p.Tyr234Cys
15			exon 7	Non-synonymous coding	g.13319G>A	c.731G>A	p.Gly244Asp
16	AML86	M1	exon 5	Non-synonymous coding	g.12334A>G	c.395A>G	p.Lys132Arg
17	AML101	M0	exon 5	Stop gained	g.12369C>T	c.430C>T	p.Gln144Stop

Несмотря на немногочисленность подгруппы пациентов с ОНЛЛ, вариант М0, в пределах данной подгруппы выявлены 2 случая мутации в экзоне 5 и экзоне 6 (таблица 2), что составляет  $28,6 \pm 17,1$  %.

В группе ОНЛЛ вариант М1 среди 29 пациентов были выявлены 5 случаев с мутациями ( $17,2 \pm 7,0$  %). У пациентов AML55 и AML71 были одновременно выявлены 2 различные мутации в пределах 6-го и 7-го экзонов соответственно. При этом следует отметить, что у пациента AML55 одна из мутаций является синонимической и не приводит к изменению первичной структуры белка p.Glu224Glu. Кроме этого, в 1 случае в данной подгруппе мутация была локализована в пределах 9-го интрона (AML06).

1 случай мутации был выявлен в подгруппе ОНЛЛ М2, насчитывающей 25 пациентов, что составляет  $4,0 \pm 3,9$  %. В подгруппе острого про-

миелоцитарного лейкоза мутации p53 отсутствовали. В относительно немногочисленной подгруппе ОНЛЛ вариант М4 выявлены 2 мутантных случая ( $15,4 \pm 10,0$  %). У 1 пациента (AML27) выявлены одновременно две различные мутации, локализованные в 7 и 8 экзонах.

Распространенность мутаций гена p53 по подгруппам исследования наглядно представлена на рисунке 3.

Подавляющее большинство выявленных мутаций p53 представляли собой однонуклеотидные замены, что является одним из известных свойств данного гена. Реже выявлены делеции (3 случая). При этом следует обратить внимание, что в 1 случае была идентифицирована крупная делеция, приводящая к потере 21 нуклеотида. Инсерции были выявлены в 2 случаях. При этом у пациента AML27 данный тип мутации сочетался с делецией (таблица 2).

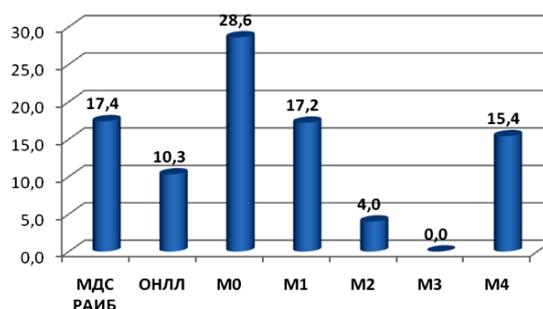


Рисунок 3 — Распространенность мутаций генов p53 в исследуемых группах и подгруппах пациентов с МДС РАИБ и ОНЛЛ

Одной из основных задач данного исследования является расширение спектра прогностических маркеров и маркеров оценки эффективности лечения ОНЛЛ. Для того, чтобы оценить, какой вклад могут внести исследуемые нами мутации в оценку прогноза и эффективности лечения и насколько они расширят традиционный спектр цитогенетических маркеров, был проведен анализ сопряженности выявленных мутаций и хромосомных aberrаций в исследуемых группах и подгруппах пациентов с МДС РАИБ и ОНЛЛ.

В соответствии с имеющимися протоколами диагностики ОНЛЛ в пределах исследуемой группы был проведен цитогенетический анализ хромосомных aberrаций. В результате этого анализа только у 25 пациентов выявлена какая-либо хромосомная aberrация, что составляет  $20,8 \pm 3,7 \%$ .

Если анализировать группу, включающую всех исследованных пациентов (120 человек), то при использовании в качестве маркеров только мутации FLT3 и NPM1 охватывается группа из 39 пациентов ( $32,5 \pm 4,3 \%$ ). Добавление в тестирование мутаций SEVPA и p53 без хромосомных aberrаций увеличивает группу с прогностическими маркерами до 60 пациентов ( $50,0 \pm 0,6 \%$ ).

Совместное использование при тестировании всех анализируемых мутаций и хромосомных aberrаций позволяет охватить прогностическими маркерами группу из 72 пациентов, что составляет  $60,0 \pm 0,7 \%$ . Таким образом, в общей группе пациентов использование молекулярно-генетических маркеров позволяет расширить группу с какими-либо прогностическими характеристиками почти на 40 %.

В группе ОНЛЛ выявлен 21 случай хромосомных aberrаций среди 97 обследованных пациентов ( $21,6 \pm 0,5 \%$ ).

При совместном использовании всех анализируемых соматических мутаций (без хромосомных aberrаций) группу с маркерами прогноза составляет 51 пациент из 97 обследованных ( $52,6 \pm 0,7 \%$ ).

Совместное использование всех анализируемых маркеров, включая хромосомные aberrации, позволяет охватить прогностическими маркерами

группу из 61 пациента ( $62,9 \pm 0,8 \%$ ). Иными словами, использование молекулярно-генетических маркеров совместно с цитогенетическими позволяет расширить группу с прогностическими маркерами на 41,3 % по сравнению с использованием только цитогенетических данных.

#### Заключение

В группе, состоящей из 23 пациентов с МДС РАИБ и 97 пациентов с ОНЛЛ, проведен молекулярно-генетический анализ распространенности соматических мутаций генов FLT3, NPM1, SEVPA и p53.

Установлено, что мутации FLT3-ITD в группе пациентов с МДС РАИБ встречаются с частотой  $8,7 \pm 5,9 \%$ , а в группе с ОНЛЛ —  $22,7 \pm 4,3 \%$ . Мутация FLT3 D835 выявлена только в группе ОНЛЛ с частотой  $7,2 \pm 2,6 \%$ .

Мутации гена NPM1 выявлены в  $8,7 \pm 5,9 \%$  случаев МДС РАИБ и  $21,6 \pm 4,2 \%$  случаев ОНЛЛ.

Соматические мутации SEVPA обнаружены в  $11,3 \pm 3,2 \%$  случаев ОНЛЛ, а в группе МДС РАИБ отсутствовали. Мутации гена p53 выявлены в  $17,4 \pm 7,9 \%$  случаев МДС РАИБ и  $10,3 \pm 0,3 \%$  случаев ОНЛЛ.

Посредством прямого секвенирования данная характеристика всем выявленным мутациям генов SEVPA и p53.

В результате проведенного анализа установлено, что использование молекулярно-генетических маркеров совместно с цитогенетическими позволяет расширить группу с прогностическими маркерами на 41,3 % по сравнению с использованием только цитогенетических данных.

Данная работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» подпрограмма «Фундаментальная и прикладная медицина», раздел 2 «Изучение патогенетических основ социально-значимых заболеваний человека для разработки методов их диагностики, лечения и профилактики» (договор № 1.2.26 от 28.02.2011 г.).

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Prognostic significance of FLT3 ITD and D835 mutations in AML patients / M. H. Sheikhha [et al.] // The Hematology Journal. — 2003. — № 4. — P. 41–46.

2. FLT3 and NPM1 Mutations in Myelodysplastic Syndromes: Frequency and Potential Value for Predicting Progression to Acute Myeloid Leukemia / A. Bains [et al.] // American Journal of Clinical Pathology. — 2011. — Vol. 135, № 1. — P. 62–69.
3. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease : Presented in part at the 42nd annual meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 3569) / S. Schnittger [et al.] // Blood. — 2002. — Vol. 100, № 1. — P. 59–66.
4. Бавыкин, А. С. FLT3-тирозинкиназа при острых нелимфоцитарных лейкозах / А. С. Бавыкин, М. А. Волкова // Онкогематология. — 2006. — № 1–2. — С. 15–24.
5. Fms Like Tyrosine Kinase (FLT3) and Nucleophosmin 1 (NPM1) Mutations in De Novo Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia (AML) / N. R. Dunna [et al.] // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. — 2010. — Vol. 11. — P. 1811–1816.
6. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML) / C. Thiede [et al.] // Blood. — 2001. — Vol. 107, № 10. — P. 4011–4020.
7. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance / R. G. W. Verhaak [et al.] // Blood. — 2005. — Vol. 106, № 12. — P. 3747–3754.
8. Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein 1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias / Gombart [et al.] // Blood. — 2002. — Vol. 99, № 4. — P. 1332–1340.
9. Characterization of CEBPA Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Most Patients with CEBPA Mutations Have Biallelic Mutations and Show a Distinct Immunophenotype of the Leukemic Cells / Lin [et al.] // Clinical Cancer Research. — 2005. — Vol. 11. — P. 1372–1379.
10. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML / Doorn-Khosrovani [et al.] // The Hematology Journal. — 2004. — № 4. — P. 31–41.
11. The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukaemia / Seifert [et al.] // Leukemia advance online publication, 8 January 2009. — doi:10.1038/leu.2008.375. PMID: 19151774.
12. Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in de novo acute myeloid leukemia / Nakano [et al.] // Eur J. Haematol. — 2000. — Vol. 65. — P. 23–31.

Поступила 19.08.2013

УДК 616.36: 611.08

## ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ

А. Г. Скуратов, Д. Р. Петренев

Гомельский государственный медицинский университет

**Цель:** изучить теоретические основы и провести экспериментальное обоснование эффективности выделения изолированных гепатоцитов методом ферментативной перфузии печени.

**Материалы и методы.** Крысы линии Вистар массой 200 г, выделение гепатоцитов методом ферментативной перфузии печени, световая микроскопия, оценка функциональной способности клеток синтезировать и накапливать гликоген.

**Результаты.** Показана высокая эффективность метода адаптированной 2-стадийной ферментативной перфузии печени для выделения изолированных гепатоцитов. Получена культура жизнеспособных гепатоцитов с сохраненными морфологическими и функциональными свойствами.

**Ключевые слова:** ферментативная перфузия печени, изолированные гепатоциты.

## ISOLATION OF HEPATOCYTES

A. G. Skuratov, D. R. Petreniov

Gomel State Medical University

**Objective:** to study the theoretical basis and give the experimental validation of the efficiency of hepatocyte isolation by the method of enzymatic perfusion of the liver.

**Material and methods.** Wistar rats at a mass of 200 g, isolation of hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver, light microscopy, assessment of functional cell capacity to synthesize and accumulate glycogen.

**Results.** The article shows the high efficiency of the method of the 2-step adapted enzymatic perfusion of the liver to isolate hepatocytes. The culture of viable hepatocytes with preserved morphological and functional properties was obtained.

**Key words:** enzymatic perfusion of the liver, isolated hepatocytes.

### Введение

Использование изолированных гепатоцитов является прогрессивной технологией, используемой в современной биохимии, клеточной биологии, фармакологии и токсикологии для изучения особенностей протекания метаболических процессов, жизнедеятельности и функциональной активности клеток, а также оценки фармакологического (токсического)

действия различных факторов химической и физической природы и экспериментального (доклинического) изучения эффективности гепатопротективных препаратов [1].

Первичные гепатоциты стали одними из первых типов клеток, использованных для клинических целей — клеточной терапии больных с врожденными и приобретенными поврежденными печени [2, 3, 4]. Однако по