

РОЗРОБКА ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ РН-ЛЕЙКЕМІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

С. С. Малюта, Г. Д. Телегеев, М. В. Дибков, Д. О. Мірошниченко,
Г. В. Єльська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

Надійшла до редакції 08.04.05

Резюме: Філадельфійська хромосома – головний маркер розвитку пухлини для більшості пацієнтів з хронічною мієлопроліферативною лейкемією та для значної кількості хворих на гострий лімфобластний лейкоз. Вона обумовлена реципрокною транслокацією між 9 та 22 хромосомами. На молекулярному рівні утворення хромосоми супроводжується утворенням гібридного *bcr/abl*-гена. У даній роботі наведені відомості щодо розробки вітчизняної тест-системи для детекції гібридного гена методом полімеразної ланцюгової реакції. Показано, що використання у системі специфічного поєднання праймерів підвищує вірогідність отриманих результатів.

Ключові слова: Ph-позитивна лейкемія, *BCR/ABL*, діагностика, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

С. С. Малюта, Г. Д. Телегеев, М. В. Дибков, Д. О. Мірошниченко, А. В. Єльська. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РН-ЛЕЙКЕМИЙ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ.

Резюме: Филадельфийская хромосома – главный маркер роста опухоли для большинства пациентов с хронической миелоидной лейкемией и острым лимфобластным лейкозом. Она обусловлена реципрокной транслокацией между 9 и 22 хромосомами. На молекулярном уровне образование хромосомы сопровождается образованием гибридного *bcr/abl*-гена. В работе представлены данные о разработке отечественной тест-системы для определения наличия гибридного гена методом полимеразной цепной реакции. Показано, что использование в системе специфического сочетания праймеров позволяет повысить достоверность получаемых результатов.

Ключевые слова: Ph-позитивная лейкемия, *BCR/ABL*, диагностика, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

S. S. Maliuta, G. D. Telegееv, M. V. Dybkov, D. O. Miroshnychenko, A. V. El'skaya. TEST-SYSTEM DEVELOPMENT FOR PH-LEUKAEMIA DIAGNOSTICS BY POLYMERASE CHAIN REACTION.

Abstract: The hallmark of tumor growth for the majority of patient with chronic myelogenous leukemia is Philadelphia chromosome (Ph') – a product of reciprocal translocation of 9 and 22 chromosomes. At the molecular level it is connected with *bcr/abl*-fusion gene. This paper presents data of development of national test-system for detection of hybrid gene with PCR method. It was shown that specific combination of primers used allow to advance a probability to obtain the correct data.

Keywords: Ph-positive leukaemia, *BCR/ABL*, diagnostics, PCR.

1. ВСТУП

Різного роду лейкемії складають близько 5 % від загальної кількості онкологічних захворювань. Смертність від лімфом та лейкемій становить близько 1,3–1,7 % від загальної, що

складає більше 10 % смертності від онкологічних захворювань.

Методи діагностики лейкозів, що застосовуються в повсякденній практиці, включають використання простих цитологічних критеріїв, таких, як форма та розмір клітин,

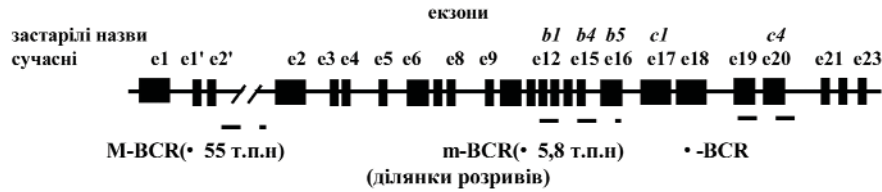


Рис. 1, а. Схематичне зображення гена *bcr* та основні ділянки розривів при утворенні химерного гена *bcr/abl*

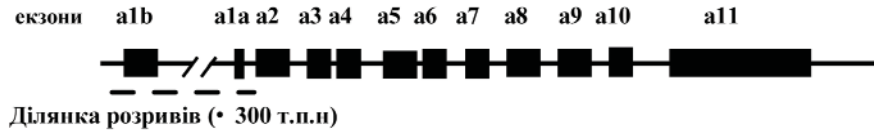


Рис. 1, б. Схематичне зображення гена *abl* та ділянки розривів при утворенні химерного гена *bcr/abl*

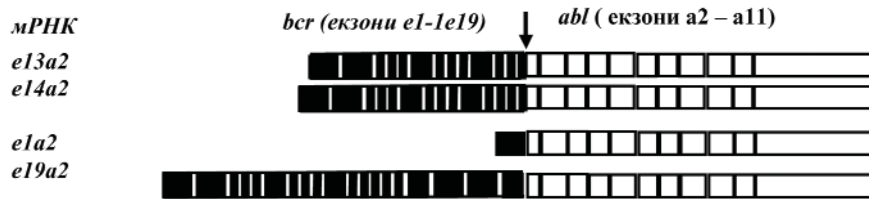
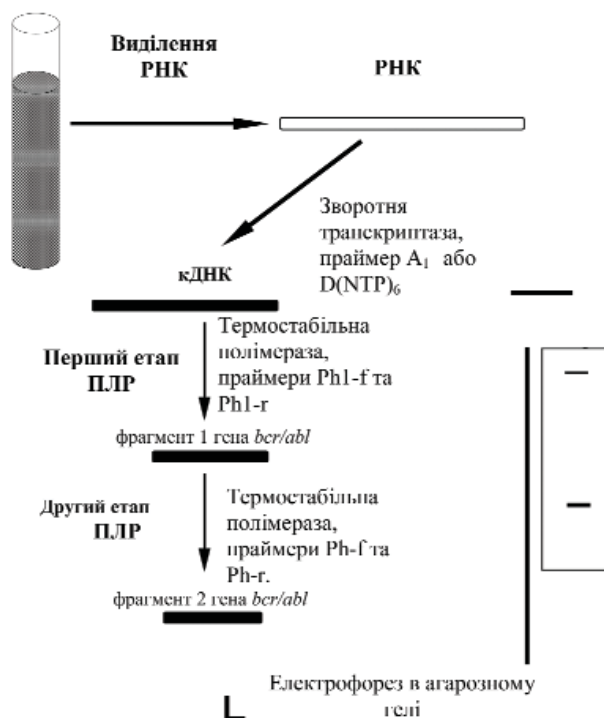


Рис. 1, в. Схематичне зображення основних типів химерних мРНК *bcr/abl*, що утворюються в наслідок розривів в різних ділянках гена *bcr*

характер зернистості цитоплазми, ядерно-цитоплазматичне співвідношення, структура ядра тощо. Ці методи доповнюються також цитохімічними методами (визначення активності кислоти фосфатази, мієлопероксидази, PAS-реакція) [1]. На підставі результатів, що дають ці методи, можна встановити вірогідний діагноз для більшості пацієнтів. Уточнення ж природи конкретного лейкоемічного клона вимагає проведення імунофенотипування та цитогенетичного аналізу. Використання моноклональних антитіл, а також імунофлуоресцентних та імуноферментних методів дозволяє більш точно встановлювати рідкісні форми та варіанти лейкозів і, таким чином, застосовувати відповідні методи лікування [2, 3].

Хромосомні транслокації виявляються при більшості неоплазій у людини і головним чином саме вони зумовлюють один чи декілька етапів розвитку пухлини.

У зв'язку з цим результати цитогенетичного аналізу, під час якого виявляють характерні аномалії (транслокації, інверсії, делеції тощо) шляхом диференційного забарвлення хромосом, мають самостійне діагностичне і прогностичне значення [4–6]. Першим подібним маркером росту пухлини була маленька G-забарвлена хромосома, описана в 1960 р. і названа філадельфійською (Ph') [7]. Утворення даної хромосоми обумовлене реципрокною транслокацією між 9 і 22 хромосомами $t(9;22)(q34;q11)$ [8]. Вона виявляється приблизно у 95 % хворих на хронічну гранулоцитарну лейкомію, а також у 25–30 % дорослих та 2–10 % дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкомію (ГЛЛ) [9]. На молекулярному рівні утворення Ph'-хромосоми супроводжується утворенням нового злитого *bcr/abl*-гена (представленого на 5'-кінці ділянкою гена *bcr*, а на 3'-кінці – ділянкою гена *abl* (рис.1) [10]. Як показали чис-

Рис. 2. Схема виявлення гена *bcr/abl* методом ПЛР

ленні експерименти, саме продукт транскрипції гена *bcr/abl* є головним етіологічним моментом у розвитку Ph⁺-лейкемії. Наявність цього гена в клітинах крові та кісткового мозку дозволяє виявляти Ph⁺ хромосому методами молекулярної біології.

Сучасні молекулярно-біологічні методи включають використання геномних зондів [11, 12], полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [13, 14], флюоресценції *in situ* гібридизації (FISH) [15], PCR in cell [16] тощо.

Найбільш простим і чутливим є метод полімеразної ланцюгової реакції.

Тест-системи для діагностики лейкемії, що наразі використовуються в Україні, закуповуються за кордоном. В Україні такі тест-системи не розроблялися. Дана робота присвячена розробці вітчизняної тест-системи для детекції гібридного *bcr/abl*-гена, що є маркером хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) та значної кількості гострих лімфоб-

ластних лейкозів. Створення такої системи є доцільним як з економічних міркувань (значна вартість закордонних аналогів), так і виходячи з отриманих в нашій лабораторії даних щодо високої нестабільності *bcr*- та *abl*-генів, внаслідок чого потрібне використання додаткових праймерів.

В основу пропонованої тест-системи поставлена задача створення такого методу, який би підвищив достовірність діагностики для людей з мієлопрофілеративними захворюваннями за рахунок створення умов зменшення негативних моментів полімеразної ланцюгової реакції шляхом врахування нестабільності пухлинного геному.

2. КЛІНІЧНІ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використовували зразки крові хворих, які проходили лікування у гематологічних клініках м. Києва. На рис. 2 схематично зображені основні етапи виявлення Ph⁺-хромосоми у клітинах крові хворих.

РНК отримували методом, описаним в [17]. Реакційна суміш для синтезу кДНК містила 1–5 мкг РНК, 10 рМ праймера A1 (5'-TGATTATAGCCTAAGACCCGGA-3') (рис. 2 та 3) або розсіяного праймера d(NTP)₆, 20 одиниць зворотної транскриптази M-MLV (GibcoBRL), 10–20 одиниць РНазину, 1мМ dNTP та буфер для зворотної транскриптази. Загальний об'єм суміші – 40 мкл. Синтез проводили при 37 °С протягом 1 год. Аліквоти реакційної суміші (5–10 мкл) використовували для проведення ампліфікації. На першому етапі проводили 30 циклів полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів Ph1-f та Ph1-r в об'ємі 30 мкл (рис. 3) за умов, рекомендованих фірмою-виготовлювачем Taq-полімерази. Температурний режим синтезу був: 94 °С – 18 сек, 55 °С – 18 сек, 72 °С – 1 хв. Далі проводили другий етап ПЛР з використанням

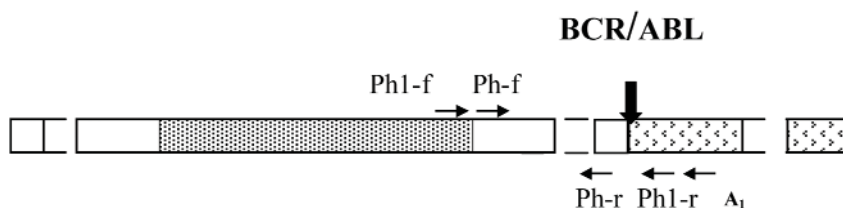


Рис. 3. Схема розміщення праймерів, що використовувались для ампліфікації гібридної ділянки *bcr/abl*

праймерів Ph-f та Ph-r (рис. 3) 94 °C – 24 сек, 58 °C – 18 сек, 72 °C – 1 хв. Продукти ампліфікації аналізували в 1,5 %-ому агарозному гелі.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Полімеразна ланцюгова реакція використовується для отримання значної кількості певних ділянок молекули ДНК. Це досягається проведенням кількох (до 40) циклів, кожен з яких включає стадії денатурації, відпау та синтезу. На стадії синтезу відбувається копіювання ДНК-ланцюга (на ділянці, обмеженій спеціально підібраними праймерами) термостабільним ферментом.

У нашому випадку напрацьовувалась ділянка гібридного гена *bcr/abl*. У зв'язку з тим, що розрив у генах *bcr* та *abl* відбувається на значних за розміром ділянках, це робить проблематичним застосування ДНК у полімеразній ланцюговій реакції. Тому для діагностики використовують дослідження РНК, яка має значно менший розмір. Нами було перевірено декілька наборів фірм-виробників MoBio, Sigma, Quagene для виділення РНК (табл. 1). Всі ці набори базуються на використанні принципу сорбції-десорбції РНК на колонках.

При використанні цих наборів були помічені такі особливості. Набори вимагають більш точного (аніж за методом Chomczynski та Sacchi) обрахунку кількості клітин крові пацієнтів, оскільки всі вони мають малу ємність, яка, до того ж, різниться для різних

наборів. При її перевищенні відбувається значне забруднення препарату РНК домішками ДНК та білку, а в ряді випадків і повна деградація РНК. На це слід звертати особливу увагу, оскільки кількість клітин крові у пацієнтів, що перевіряються на позитивні Ph-лейкемії, в залежності від стадії захворювання та індивідуальних особливостей може різнитися на кілька порядків. Тому кількість крові необхідно розраховувати для кожного пацієнта індивідуально, виходячи з даних загального аналізу крові.

Наступним етапом було отримання копійної ДНК (кДНК), яку синтезували за допомогою зворотної транскриптази, використовуючи РНК як матрицю, а праймер A1 – як затравку (або розсіяного праймера d(NTP)₆) (рис. 2, 3; табл. 1).

Перший етап ПЛР, котрий проводили з використанням праймерів Ph1-f та Ph1-r, не дає такої кількості продукту, котра необхідна

Таблиця 1. Перелік праймерів для виявлення Ph-хромосоми

Назва праймеру	Нуклеотидний склад
A ₁	5-TGATTATAGCCTAAGACCCGGA-3
A ₃	5-TCAGACCCTGAGGCTCAAAGTC-3
B ₁	5-GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC-3
B ₂	5-GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC-3
B ₁ ¹	5-CGCATGTTCCGGGACAAAAGC-3
B ₁ ²	5-ACCATCGTGGGCGTCCGCAAGA-3
Ia	5-ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT-3
Ib	5-GCAGCAGCCTGGAAAAGTACTT-3

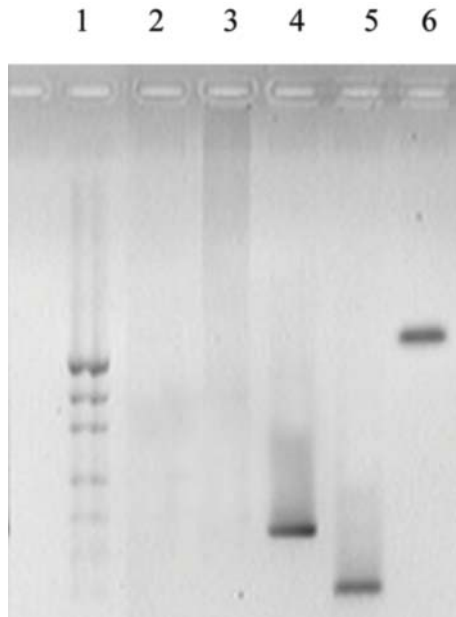


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ПЛР, що були отримані при дослідженні крові хворого Н: 1 – маркер молекулярної ваги; 2 – негативний контроль; 3 – продукт ПЛР з використанням стандартного набору (B2-A3); 4, 5 – позитивний контроль -176 п.н., -118 п.н.; 6 – продукт ПЛР з використанням праймерів Ph-f та Ph-r -590 п.н.

для візуального виявлення в агарозному гелі. Тому проводили другий етап ПЛР, використовуючи аліквоту ПЛР продукту з першого етапу та інші (внутрішні) праймери Ph-f та Ph-r (рис. 3). Праймери Ph1-f, Ph1-r, Ph-f та Ph-r були підібрані за допомогою програми GeneRunner. При цьому враховували такі параметри, як довжина праймера, температура плавлення та компліментарність праймерів між собою.

Приведені дані свідчать про високу ефективність ПЛР в діагностиці хворих з невизначеним діагнозом. Використання ПЛР дає змогу виявляти мінімальну кількість патологічних клітин (10^{-4} – 10^{-5}), що дуже важливо для ранньої діагностики.

На рис. 4 наведені результати аналізу крові хворого Н. з використанням стандарт-

ного набору праймерів та праймерів, що пропонуються. Як бачимо, використання стандартних праймерів [13, 14] не виявляє гібридного *bcr/abl*-гена (рис. 4, доріжка 3), в той час, як використання Ph-праймерів детектувало наявність такої перебудови. Подальше секвенування гібридної ділянки показало, що стандартний праймер не мав зони комплементарності в гібридному гені.

Таким чином, запропонований метод дає змогу прогнозувати подальший перебіг захворювання, оцінювати цитогенетичну ремісію та ефективність лікування. Використання запропонованого способу з праймерами Ph1-f, Ph1-r, Ph-f, Ph-r дає можливість підвищити достовірність отриманих результатів діагностики у хворих на мієлопрофілеративні захворювання шляхом створення умов для зменшення негативних моментів полімеразної ланцюгової реакції, а також врахування факту високої нестабільності пухлинного генома й отримання позитивної ланцюгової реакції при наявності характерної геномної перебудови (*bcr/abl*).

Висока ефективність тест-системи була апробована на більш ніж 150 зразках крові пацієнтів з різних регіонів України з підозрою на ХМЛ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П. и др. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов // Киев, Наукова Думка, 1974, 244 с.
2. Глузман Д.Ф., Бебешко В.Г., Надгорная В.А. и др. Эмбриональное кроветворение и гемобластозы у детей // Киев, Наукова Думка, 1988, 200 с.
3. Пинчук В.Г., Глузман Д.Ф., Надгорная В.А. и др. Иммуноцитохимические методы и моноклональные антитела в онкогематологии // Киев, Наукова Думка, 1990, 233 с.
4. Boehm, T.H. Rabbits A chromosomal basis of lymphoid malignancy in man // E.J.Biochem, 1989. –V.185, P. 1–17.
5. M.J. Cline The molecular basis of leukemia // The

- New England Journal of Medicine, 1994.–V.330, N5. –P. 328–336.
6. T.H. Rabbitts Chromosomal translocations in human cancer // *Nature*, 1994.–V.372, N.6502.–P. 143–149.
 7. Nowell PC, Hunderford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // *Science* 1960.–V.132, P. 1497–1499.
 8. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining // *Nature*.–1973.–V.243, N5405.–P. 290–293.
 9. Телегеев Г.Д., Дыбков М.В., Карпенко О.И., Черепенко Е.И. Молекулярные основы Ph-лейкемий и пути их лечения Биополимеры и клетка 1994; 10(5):78–92.
 10. Gishizky ML. Molecular mechanisms of Bcr-Abl-induced oncogenesis // *Cytokines Molular Therapy* 1996.–V2, N4.–P. 251–261.
 11. E.M. Southern. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electroforesis // *J. Mol.Biol.*–1975.–V.98, N.3.–P. 503–517.
 12. G.Grosveld, T.Verwoerd, T van Agthoven et al. The chronic myelocytic cell line K 562 contains a breakpoint in bcr and produces a chimeric bcr/c-abl transcript // *Molecular and Cellular Biology*, 1986.–V.6, N2.–P. 607–616.
 13. E.S.Kawasaki, S.S.Clark, M.Y.Coyne et al. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by deletion of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988.–V.85, N15.–P. 5698–5702.
 14. Maurer J., Janssen J., Thiel E., et al. Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction // *The Lancet*.–1991.–V.337, N 8749.–P. 1055–1058.
 15. Tkachuk D.C., Westbrook C.A., Andreeff M., et al. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization // *Science*.–1990.–V.250, N.4980.–P. 559–562.
 16. N.Testori, G.Martinelli, P.Farabedoli et al. A new method of "in-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction" for detection of BCR/Abl transcripts in chronic myeloid leukemia patients // *Blood*.–1996.–V.87, N.9.–P. 3884–3892.
 17. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.*–1987.–V.162.–P. 156–159.