

## Онкогематология

В результате переноса части одной хромосомы на другую может происходить слияние фрагментов с образованием химерного гена. Ген транскрибируется с образованием мРНК, с которой транслируется аномальный белок с изменёнными свойствами – химер-

ный продукт транслокации (ХПТ). Некоторые хромосомные транслокации являются специфичными для лейкозов определённого типа и ассоциируются с той или иной степенью агрессивности опухоли и ответа на химиотерапию. В таблице приведены примеры транслокаций, которые встречаются у больных с некоторыми типами лейкозов.

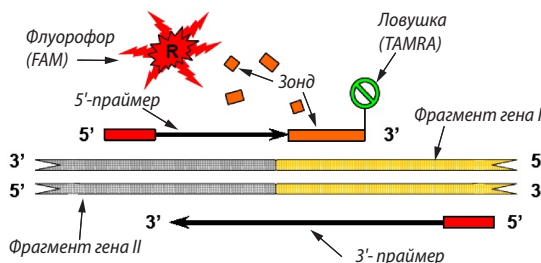
### Транслокации, встречающиеся у больных с лейкозами

	ОЛЛ/ALL	ОМЛ/AML	ХМЛ/CML
<b>BCR-ABL, t(9;22) («филадельфийская» хромосома)</b> ХПТ BCR-ABL: m-bcr (e1a2) (белок p190)	25-30% взрослых пациентов, 2-5% детей; <b>плохой прогноз</b>	Редко	>95% пациентов
M-bcr (b2a2/b3a2) (белок p210)	65% взрослых и 80% детей с «филадельфийской» хромосомой		Очень редко в хронической фазе
TEL-AML1, t(12;21)(p13q22)	20-25% детей (В-ОЛЛ), взрослые – очень редко; <b>хороший прогноз</b>	Не выявляется у детей	Подавляющее большинство пациентов
<b>AML1-ETO, t(8;21)(q22q22)</b>		2-12% больных; <b>благоприятный прогноз</b>	
<b>СВФβ-МУН11, inv(16)(p13q22)</b> ХП инверсии:		1-5% больных; <b>благоприятный прогноз</b>	
тип А		>85% пациентов с inv(16)(p13q22)	
тип D		~5% пациентов с inv(16)(p13q22)	
тип E		~5% пациентов с inv(16)(p13q22)	
прочие (~7 типов)		~5% пациентов с inv(16)(p13q22)	

Сокращения: ОЛЛ/ALL – острый лимфобластный лейкоз/acute lymphoblastic leukaemia, ОМЛ/AML – острый миелолейкоз/acute myeloid leukaemia, ХМЛ/CML – хронический миелолейкоз/chronic myeloid leukaemia

Изменение количества копий мРНК химерного продукта является показателем эффективности лечения, а также может быть независимым прогностическим фактором. Показано, что ранний ответ на терапию, выраженный в относительном количестве бластных клеток или кДНК (минимальная остаточная болезнь, МОБ), позволяет дифференцировать пациентов на группы риска по возможности рецидива и по интенсивности терапии. Классические морфологические и цитогенетические методы не обладают достаточной чувствительностью, в связи с чем для определения МОБ используются современные технологии – иммунофенотипирование методом мультипараметрической проточной цитофлуориметрии\* и различные варианты количественной полимеразной цепной реакции, в частности обратнотранскриптазной (ОТ-ПЦР). Сравнительные характеристики некоторых методик приведены в таблице.

В рамках программы «Европа против рака» была стандартизована процедура количественного анализа химерных генов, детектируемых при лейкозах, методом ОТ-ПЦР. Выработанные рекомендации используются компанией Irsogen при производстве тест-систем и стандартов FusionQuant.



В качестве исследуемого материала используется костный мозг или периферическая кровь. В последнем случае упрощается задача многократного отбора проб при длительном мониторинге. После выделения тотальной РНК проводят ОТ-ПЦР с получением первой цепи кДНК, которую затем амплифицируют с детекцией сигнала в реальном времени. Специфичность

методологии Taqman обеспечивается, во-первых, праймерами, ограничивающими химерный участок ДНК; во-вторых, меченым зондом комплементарным последовательности ДНК, расположенной в пределах ампликона.

Количество копий исследуемого гена определяют по калибровочной кривой, построенной при помощи предлагаемых стандартов ФьюжнКвант, представляющих собой химерные последовательности ДНК, введенные в состав плазмид, количество копий которых известно. Одновременно аналогичным образом анализируют эндогенный ген-калибратор, относительно которого нормализуют величины, полученные для исследуемого гена. При этом конечный результат не зависит от вариаций количества лимфоцитов в исследуемом образце.

Стабильность стандартов ФьюжнКвант позволяет использовать их для сравнения результатов, полученных в разное время и в разных лабораториях.

Тест-системы совместимы с различными моделями амплификаторов для ПЦР в реальном времени. Растворы, входящие в состав тест-систем, готовы к использованию. В состав набора входят:

- Пробирка с праймерами и зондом, специфичными к химерному гену
- Пробирка с праймерами и зондом, специфичными к гену-калибратору
- Набор стандартов химерного гена (5 концентраций)
- Набор стандартов гена-калибратора (3 концентрации)

Этот же метод положен в основу наборов ProfileQuant для анализа экспрессии генов WT1 и BAALC. Избыточная экспрессия WT1 рассматривается в качестве общего маркера острых лейкозов и может использоваться для определения МОБ.

Клональные цитогенетические аномалии – один из наиболее важных прогностических факторов при ОМЛ. Однако 45% взрослых пациентов моложе 60 лет имеют нормальный кариотип. Эта группа промежуточного риска оказывается достаточно гетерогенной с прогнозами от плохого до благоприятного. Существует необходимость в дополнительных маркерах

**Сравнительные характеристики методик для определения МОБ**

Метод	Морфология	FISH	Проточная цитофлуориметрия	ОТ-ПЦР
Предмет анализа	Клетки	ДНК	Клетки	мРНК
Среднее кол-во анализируемых клеток	100-200	100-1000	50 тыс.-1 млн	~1 млн
Чувствительность	5% (~5 опухолевых клеток на 100 нормальных)	1-2%	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-4</sup> (1 опухолевая клетка на 1-10 тыс. нормальных)	10 <sup>-4</sup> -10 <sup>-6</sup>
Скорость анализа	Низкая	Низкая	Высокая	Относительно высокая

\* См. раздел «Проточная цитометрия», стр. 485, 498

для дифференциации прогноза. BAALC избыточно экспрессируется при ОМЛ и ОЛЛ, причём экспрессия практически не детектируется у здоровых или в хронической фазе ХМЛ и при хроническом лимфоцитарном лейкозе. Высокий уровень экспрессии BAALC – неблагоприятный прогностический фактор.

Аллель-специфичная полуколичественная ПЦР в реальном времени используется в наборе **JAK2 MutaScreen**. Мутация G617T приводит к замене валина на фенилаланин (V617F) в молекуле белка JAK2 (Янус тирозинкиназа 2), что вызывает существенную активацию цитокиновых сигнальных путей. Миелопролиферативные заболевания, такие, как истинная полицитемия (ИП, болезнь Вакеза-Ослера), идиопатическая тромбоцитемия (ИТ) и идиопатический миелофиброз (ИМ), характеризуются хроническим перепроизводством клеток крови, вызванным гиперчувствительностью к цитокинам, что может приводить к тромбозам, геморагии или развитию АМЛ. Мутация JAK2 V617F обнаруживается у 70-90% больных ИП, в меньшей степени – у больных ИТ и ИМ.

Зонды на дикий тип и мутацию мечены разными флуорофорами (VIC и FAM, соответственно), что позволяет одновременно выявлять наличие того или другого аллеля. В состав набора входят положительный и отрицательный контроли ДНК, а также референсный материал, задающий пороговое значение, относительно которого и определяется наличие или отсутствие мутации.

Для анализа используется ДНК, выделенная непосредственно из цельной крови. Анализ на JAK2 V617F позволяет дифференцировать первичную и вторичную полицитемию (увеличение производства эритроцитов), а также первичный и реактивный тромбоцитоз.

### Сóлидные опухоли

Во многих солидных опухолях обнаружено увеличение количества копий гена ERBB2 (HER2/neu), кодирующего поверхностный рецептор со свойствами тирозинкиназы. Амплификация и/или увеличение уровня экспрессии HER2 запускает каскад сигналов, побуждающих клетку к бесконтрольному делению. Герцептин оказывает терапевтическое действие на 20-25% больных раком молочной железы. Именно у них наблюдается увеличение количества HER2. В связи с этим разумно проводить дополнительное тестирование на амплификацию HER2 у пациентов с первично диагностированной опухолью молочной железы.

Высокий уровень экспрессии GATA3 (и/или ESR1) ассоциируется с хорошим прогнозом для больных с тем же диагнозом. Изменение уровня экспрессии генов ESR1, GATA3, SCUBE2 является признаком, дифференцирующим подтипы рака молочной железы.

Наборы ProfileQuant позволяют количественно проанализировать уровень экспрессии этих генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА



### Наборы FusionQuant™ для определения количества копий транскриптов химерных генов

Кат.№	Описание
FQPP-01	AML1-ETO, ~25 образцов в двух последовательностях
FQPP-02	CBFβ-MYH11 A, ~25 образцов в двух последовательностях
FQPP-05	PML-RARA bcr1, ~25 образцов в двух последовательностях
FQPP-06	PML-RARA bcr2, ~25 образцов в двух последовательностях
FQPP-07	PML-RARA bcr3, ~25 образцов в двух последовательностях
FQPP-09	BCR-ABL e1a2 mbc, ~25 образцов в двух последовательностях
FQPP-10	BCR-ABL b3a2 Mbcr, ~25 образцов в двух последовательностях
FQPP-10M	BCR-ABL b3a2 Mbcr Mega, ~55 образцов в двух последовательностях
FQPP-11	TEL-AML 1 e4e11, ~25 образцов в двух последовательностях

### Наборы ProfileQuant™ для определения количества копий транскриптов генов

Кат.№	Описание
RQPP-01	WT1, 24 образца в двух последовательностях
RQPP-03	BAALC, ~25 образцов в двух последовательностях

### Наборы MutaScreen™ для детекции мутации JAK2 V617F

Кат.№	Описание
MSPP-01	JAK2, 24 образца в двух последовательностях
MSPP-02	JAK2 Мини, 10 образцов в двух последовательностях

## Стандарты FusionQuant™ с известным количеством копий генов

Гены, кодирующие нормальный белок

Кат.№	Описание
CGRS-01	ABL, 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> копий, ~8 р-ций
CGRS-02	B2M, 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> копий, ~8 р-ций
CGRS-03	GUS, 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> копий, ~8 р-ций
CGRS-04	TBP, 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , ~8 р-ций
CFGR-29	SRY3
CFGR-30	β-глобин

Химерные последовательности (10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> копий)

Кат.№	Описание
FGRS-01	AML1-ETO, ~8 р-ций
FGRS-02	CBFβ-MYH11 A, ~8 р-ций
FGRS-03	CBFβ-MYH11 D, ~8 р-ций
FGRS-04	CBFβ-MYH11 E, ~8 р-ций
FGRS-05	PML-RARA bcr1, ~8 р-ций
FGRS-06	PML-RARA bcr2, ~8 р-ций
FGRS-07	PML-RARA bcr3, ~8 р-ций
FGRS-08	E2A-PBX1, ~8 р-ций
FGRS-09	BCR-ABL e1a2 mbcr, ~8 р-ций
FGRS-10	BCR-ABL b3a2 Mbcr, ~8 р-ций
FGRS-11	TEL-AML 1 e4e11, ~8 р-ций
FGRS-12	SIL-TAL, ~8 р-ций
FGRS-13	MLL-AF4 e10e4 = RS411 type, ~8 р-ций
FGRS-14	MLL-AF4 e9e5 = MV411 type, ~8 р-ций
FGRS-15	MLL-AF4 e11e5 = ALL-PO type, ~8 р-ций
FGRS-16	MLL-AF9 type A, ~8 р-ций
FGRS-17	MLL-AF9 type B, ~8 р-ций
FGRS-18	MLL-AF6, ~8 р-ций
FGRS-19	MLL-DUP, ~8 р-ций
FGRS-20	MLL-ENL e9e2, ~8 р-ций
FGRS-21	MLL-ENL e10e2, ~8 р-ций
FGRS-22	MLL-ENL e11e2, ~8 р-ций
FGRS-23	MLL-AF9 e8e10, ~8 р-ций
FGRS-24	MLL-ELL e9e2, ~8 р-ций
FGRS-25	MLL-ELL e8e2, ~8 р-ций
FGRS-26	MLL-AF1p e10e2, ~8 р-ций
CFGR-27	RARA-PML bcr1-2
CFGR-28	RARA-PML bcr3

Положительные клеточные контроли транслокаций

Кат.№	Описание
PCCL-01	BCR-ABL p210
PCCL-02	BCR-ABL p190

## Сóлидные опухоли

Наборы ProfileQuant™ для количественного определения транскриптов опухолевых маркеров

Кат.№	Описание
PQST-01	ESR1, ~50 образцов в двух последовательностях
PQST-02	ERBB2/HER2/неи, ~50 образцов в двух последовательностях
PQST-03	GATA3, ~50 образцов в двух последовательностях
PQST-04	SCUBE2, ~50 образцов в двух последовательностях