

Методы молекулярной диагностики в гематологии

А.В. Мисюрин

Введение.

Методы молекулярной диагностики в гематологии и трансфузиологии применяются для выявления причины патологического состояния, установления диагноза и контроля эффективности лечения на уровне геномной ДНК, РНК и белков. При этом в основе подавляющего большинства современных методов молекулярной диагностики лежат три природных явления.

Во-первых, комплементарное взаимодействие нуклеиновых кислот, за счет которого можно осуществлять гибридизационное взаимодействие изучаемого образца ДНК или РНК со специфической пробой (зондом). На этом принципе основаны такие важные методы, как гибридизация по Саузерну и Нозерн-гибридизация, анализ экспрессии генов при помощи олигонуклеотидных микрочипов. Кроме того, олигонуклеотиды, комплементарные изучаемому участку ДНК, применяют при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real Time PCR или RQ PCR). Анализ первичной последовательности ДНК (секвенирование), который дает прямую информацию о нарушениях структуры генов, в настоящее время так же проводят с использованием комплементарных олигонуклеотидов (модифицированный метод Сэнгера). На основе принципа комплементарного взаимодействия цепей ДНК работает метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), без которого невозможно себе представить современную цитогенетическую диагностику. При помощи совокупности этих методов можно выявлять клинически значимые маркеры, проводить поиск новых генных маркеров, характерных для различных заболеваний системы кроветворения, а также определять количество опухолевых клеток в костном мозге и периферической крови, что очень важно для оценки эффективности лечения гемобластозов.

Во-вторых, используется способность иммунной системы высших организмов производить особые белки – антитела, которые могут специфически взаимодействовать с различными молекулами и молекулярными комплексами. При помощи гибридной технологии можно получать моноклональные антитела с заданной специфичностью и в необходимом количестве. Специфические антитела применяют для определения иммунофенотипа клеток. При этом с помощью антител окрашивают мазки крови и костного мозга или анализируют связавшие антитела клетки при помощи проточного цитофлуориметра. Кроме того, специфические антитела используют при проведении иммуноферментного анализа (ИФА или ELISA), анализа белков при помощи Вестерн-блоттинга. С помощью антител определяют группы крови, иммунную совместимость доноров и реципиентов костного мозга.

В-третьих, ряд методов молекулярной диагностики базируется на способности особых ферментов – эндонуклеаз рестрикции или рестриктаз –

расщеплять ДНК в характерных нуклеотидных последовательностях (сайтах), узнавание которых определено специфичностью применяемой рестриктазы. Открытие этих ферментов в начале 1970-х гг. заложило основы нового раздела экспериментальной молекулярной биологии – генетической инженерии. При помощи рестриктаз и специфических зондов, комплементарных изучаемому участку геномной ДНК, можно выявлять мутации генов, приводящие к развитию наследственных или онкологических заболеваний.

Особенности молекулярной диагностики наследственных заболеваний.

Молекулярная диагностика наследственных заболеваний системы кроветворения чаще всего осуществляется при помощи амплификации с помощью ПЦР участков генов, в которых могут возникать клинически значимые мутации. Продукты ПЦР – ампликоны – представляют собой многократно увеличенное число копий изучаемого участка гена. Размер ампликонов (обычно от 100 до 1500 пн) ограничен ферментативными свойствами применяемых для ПЦР полимераз, а также тем, какие задачи решаются при проведении диагностики. Появление усовершенствованных полимераз, обладающих высокой процессивностью и способных синтезировать при ПЦР фрагменты ДНК, достигающие в длину нескольких десятков тысяч пар оснований нуклеотидов, сильно расширило разрешающую способность молекулярной диагностики, но пока такие полимеразы применяются недостаточно широко из-за высокой стоимости. Ампликоны очищают и затем определяют их первичную последовательность. Этот способ диагностики наиболее достоверен, так как он позволяет получить прямую информацию о том, мутирован или нет изучаемый участок гена. Некоторые мутации меняют последовательность ДНК таким образом, что нарушается или, наоборот, возникает заново сайт узнавания какой-нибудь из многочисленных коммерчески доступных рестриктаз. В этом случае о наличии мутации можно судить по тому, проходит или нет расщепление ампликона по сайту узнавания рестриктазой при проведении соответствующей реакции (ПДРФ-анализ или анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов). Кроме того, можно применить для ПЦР-амплификации специально подобранные сайт-специфические олигонуклеотидные праймеры, которые могут распознавать дикий и мутированный по данному локусу аллель гена. Но этот способ оценки мутаций, как и предыдущий, основанный на применении рестриктаз, при несоблюдении ряда важных условий проведения реакции может приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. Правильно интерпретировать результаты такой диагностики может только специалист, обладающий высокой квалификацией и опытом. Другие способы тестирования мутаций основаны на анализе конформационных различий между ампликонами, соответствующими норме, и такими ПЦР-продуктами, которые получаются при ПЦР-амплификации мутантных аллелей. Конформационные особенности ампликонов выявляют по изменению подвижности фрагментов ДНК при особых способах проведения электрофореза или при помощи денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (D-HPLC). Кроме того, присутствие мутационных различий ампликонов можно выявлять по оценке флуоресцентных сигналов при проведении ПЦР в реальном времени. При этом различия в сигналах флуоресценции для нормы и патологии получают путем построения кривых плавления в присутствии

интеркалирующего красителя SYBR Green I или за счет применения несущих флуоресцентную метку сайт-специфических олигонуклеотидных праймеров. Иногда моногенные наследственные заболевания системы кроветворения возникают в результате одной либо ограниченного числа мутаций того или иного гена, повторяющихся у разных пациентов. В этом случае ситуация достаточно проста и диагностика становится стандартной и инвариантной и сводится к повторению одной и той же процедуры. Но очень часто мутации бывают рассеяны по разным участкам многочисленных экзонов, составляющих структурную часть гена. Серьезные последствия для работы гена влекут за собой также дефекты, возникающие в сайтах сплайсинга, которые включают в себя часть нуклеотидов интронов. Сказываются на эффективности работы гена и мутации в регуляторных областях (промотор, энхансеры, сигнал полиаденилирования). В настоящее время подробный анализ структуры любого из примерно 30000 человеческих генов не представляет никаких затруднений с технологической точки зрения, но в качестве рутинной диагностики он не применяется из-за существенной дороговизны такой работы. В том случае, когда материальные ограничения являются препятствием для поиска истинного генетического дефекта, послужившего причиной развития наследственного заболевания, - прибегают к методам косвенного молекулярно-генетического анализа. При этом анализируют нейтральные по отношению к заболеванию полиморфные маркеры, которые расположены внутри того же гена, в котором возникла патогенетическая мутация. Проводят семейный анализ, т.е. прослеживают наследование признака патологии среди членов одной семьи и сопоставляют с передачей по наследству полиморфных внутригенных маркеров. В результате этого выявляют совпадение наследования признака болезни и одного из вариантов полиморфного маркера для данной семьи. В дальнейшем при обследовании членов этой семьи руководствуются наличием или отсутствием варианта полиморфного маркера, сцепленного с мутацией, ответственной за развитие наследственного заболевания. Если у следующего члена семьи обнаружится такой вариант полиморфного маркера, то делают вывод о носительстве дефектного гена, а при проведении пренатальной диагностики таким образом можно установить, здоров ли плод. В качестве непрямых маркеров для косвенной молекулярно-генетической диагностики чаще всего используют лежащие в некодирующих участках генов полиморфные локусы (VNTR – variable number of tandem repeats и STR – short tandem repeats), представляющие собой короткие повторы одной и той же последовательности, например, АСТС. В человеческой популяции могут присутствовать несколько (от 4 и более 10) аллельных вариантов одного гена, которые различаются между собой по данному локусу количеством повторений того или иного короткого мотива. При проведении ПЦР-амплификации с использованием олигонуклеотидных праймеров, комплементарных данному мультиаллельному полиморфному локусу и ограничивающих собой участок, в котором расположены короткие повторы, разные аллельные варианты гена будут приводить к наработке ампликонов, размер которых определяется количеством содержащихся в них повторов. При электрофоретическом разделении продуктов такой ПЦР-амплификации все гетерозиготы будут иметь по два ампликона разного размера (две полосы на геле), а сигнал, получаемый для гомозигот, выявится в виде ПЦР-продуктов одного размера (одна полоса на геле). Для косвенной диагностики применяют также однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), которые почти всегда бывают

биаллельны. Для анализа таких полиморфизмов часто используют эндонуклеазы рестрикции. Дело в том, что таких полиморфизмов очень много в любом из человеческих генов и для косвенной диагностики всегда можно выбрать такие из них, которые затрагивают сайты известных и доступных рестриктаз.

Очень эффективным способом выявления нонсенс-мутаций, которые выражаются в появлении внутри гена аномальных стоп-кодонов, является следующий тест (метод РТТ – *peptide truncation test*). С помощью реакции обратной транскрипции получают полноразмерную к-ДНК (ДНК-копию), которая содержит всю информацию о структурной части гена, кодирующую соответствующий белок. Затем при помощи генно-инженерных методов клонируют к-ДНК в составе специального вектора, содержащего сигналы, с помощью которых можно осуществить *in vitro* транскрипцию клонированной последовательности, а затем трансляцию с использованием метионина, содержащего радиоактивный изотоп серы. После этого полученный радиоактивный белок анализируют при помощи электрофореза и радиоавтографии и в результате получают информацию о размере анализируемого белка. Если его размер оказывается меньше, чем у белка дикого типа, соответствующего норме, делают вывод о наличии у данного пациента нонсенс-мутации.

Диагностика генетических аномалий, приводящих к нарушению работы системы свертывания крови.

Мутации генов VIII, IX и XI факторов свертываемости крови приводят к развитию гемофилий А, В и С. Нарушения работы генов VIII и IX факторов передаются по рецессивному, связанному с полом типу наследования, так как эти гены расположены в половой X хромосоме (при этом болеют мужчины, женщины являются носительницами гена гемофилии). Болезнь фон Виллебранда возникает при нарушениях структуры гена *vWD*, кодирующего фактор фон Виллебранда, который так же является одним из важных компонентов системы свертываемости крови. Болезнь фон Виллебранда и гемофилия С – это заболевания с аутомсомным, не связанным с полом типом наследования (болеют и мужчины, и женщины). Клинически данные заболевания проявляются в повышенной кровоточивости. Обильные кровотечения возникают даже после незначительных травм, нарушается функция конечностей из-за кровоизлияний в суставы, массивные гематомы вызывают сдавление сосудов и нервов, что приводит к параличам, ишемии и некрозу органов. При болезни фон Виллебранда различают тяжелую и умеренную форму заболевания, которые зависят от того, в каких участках гена *vWD* возникает мутация. Обычно тяжелые формы болезни фон Виллебранда развиваются при мутациях, приводящих к аминокислотным заменам в домене, отвечающим за образование функционально активного комплекса из четырех молекул этого белка.

При данных заболеваниях известно множество мутаций, которые часто оказываются уникальными для конкретного пациента, поэтому при проведении молекулярно-генетической диагностики часто прибегают к косвенным методам, основанным на изучении родословной семьи путем сопоставления наследования признака заболевания с анализом

распределения среди членов семьи полиморфных маркеров. При гемофилии А также определяют встречающиеся у половины всех больных повторяющиеся инверсии, нарушающие работу гена VIII фактора свертываемости крови. При гемофилии В поиск истинных мутаций упрощен относительно небольшими размерами гена, кодирующего IX фактор свертываемости крови. При мутационном анализе болезни фон Виллебранда особое внимание уделяют тем дефектам гена vWD, которые приводят к тяжелым формам этого заболевания. При проведении косвенного анализа носительства дефектного гена при этом заболевании используют три STR-полиморфизма из 40 интрона гена vWD. Мутации ряда генов приводят к тромбофилии, т.е. к увеличению свертывающей активности крови. В первую очередь, это известная Лейденская мутация (точечная мутация G1691A) гена V фактора свертываемости крови. Второй по значимости генетический дефект, увеличивающий предрасположенность к развитию тромбозов и инфаркту миокарда, - частая мутация II фактора свертывания крови или протромбина (точечная мутация G20210A). Кроме того, артериальные и венозные тромбозы часто ассоциированы с гомозиготным состоянием по точечной мутации C677T гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR). Мутация в гене MTHFR вызывает гиперцистеинемию, которая, как предполагают, приводит к активации эндотелия, усилению пролиферации клеток гладкой мускулатуры, изменению уровня производства эндотелием окиси азота, а также к нарушению в эндотелии метаболизма стерола, что влечет за собой усиление тромбообразования. Обнаружена предрасположенность к инфаркту миокарда у лиц, имеющих точечную мутацию в VII факторе свертываемости крови, ведущей к аминокислотной замене R353Q. Молекулярную диагностику этих генетических дефектов можно проводить при помощи прямого секвенирования ПЦР-продуктов, но чаще используют ПДРФ-анализ, так как эти точечные мутации нарушают сайты, узнаваемые рестриктазами.

Диагностика генетических аномалий, приводящих к наследственным болезням накопления.

Наследственный гемохроматоз. Ген HFE (HLA-H) расположен на 6 хромосоме человека и кодирует белок, строение которого гомологично строению молекулы системы MHC (major histocompatibility complex) класса I. Точечные мутации гена HFE приводят к перегрузке организма железом, в результате чего развивается заболевание, известное как наследственный гемохроматоз. Наиболее важной точечной мутацией гена HFE, ответственной за развитие гемохроматоза, является замена основания G на C, в результате которой в соответствующем белке цистеин в положении 282 заменяется на тирозин (C282G). В результате этого не может образоваться стабилизирующая белок HFE дисульфидная связь, альфа-3 домен HFE больше не образует комплекс с бета-2-микроглобулином и белок HFE разрушается еще до того, как он встраивается в клеточную мембрану. Поскольку белок HFE является негативным регулятором всасывания железа, то в его отсутствии клетки оказываются перегруженными ионами этого металла. Наиболее тяжелые формы гемохроматоза развиваются при гомозиготном состоянии гена по мутации C282G, т.е. в том случае, когда обе копии гена, доставшиеся от родителей, несут этот дефект. В гетерозиготном состоянии эта мутация редко приводит к развитию этого заболевания. В том случае, если болезнь у гетерозигот все же развивается, то очень часто вторая копия гена несет

мутацию H63D. В итоге до 90% пациентов с типичным фенотипом врожденного гемохроматоза являются гомозиготными по мутантному C282Y, меньшая часть больных - смешанными гетерозиготами (C282Y/H63D), а болезнь передается по наследству по аутосомно-рецессивному принципу. Кроме того, в разных экзонах гена HFE, как у больных гемохроматозом, так и у здоровых людей, обнаружено много других единичных замен нуклеотидов, влияние которых на патогенез этого заболевания пока не выяснено. Мажорные мутации C282Y и H63D меняют сайты узнавания рестриктаз, поэтому для их анализа чаще всего используют ПЦР-амплификацию с последующим гидролизом ампликонов соответствующими рестриктазами. Кроме того, для анализа этих мутаций применяют сайт-специфические праймеры и метод ПЦР в реальном времени.

Болезнь Коновалова-Вильсона. Накопление меди до токсичного уровня в организме может быть связано с аутосомно-рецессивным моногенным наследственным заболеванием, называемым болезнью Коновалова-Вильсона. При этой патологии в первую очередь поражаются печень, мозг и почки. Частота встречаемости этого заболевания составляет 1 на 30000, что соответствует рецессивному носительству генетического дефекта, способного привести к болезни Коновалова-Вильсона, у каждого 90 человека. Ген ATP7B, который вовлечен в патогенез этого заболевания, расположен на 13 хромосоме (в локусе 13q14.3-q21.1). Этот ген кодирует белок – переносчик меди, принадлежащий к семейству АТФ-зависимых переносчиков ионов тяжелых металлов, причем представители этого семейства есть не только у высших организмов, но и у бактерий. Ген ATP7B имеет очень большой размер и сложную организацию, состоит из 21 экзона, которые вместе с интронами занимают участок геномной ДНК длиной свыше 100 тыс. п.н. Чаще всего среди европейцев, страдающих этим заболеванием, встречается точечная мутация гена ATP7B, приводящая к аминокислотной замене His1069Glu, доля которой достигает 38% случаев. Для молекулярной детекции этой мутации применяют ПЦР с использованием сайт-специфических праймеров. На сегодняшний день известно свыше 150 мутаций этого гена, которые могут выявляться в разных экзонах, а также в интронных последовательностях, ответственных за прохождение сплайсинга и созревание м-РНК ATP7B. Среди этих мутаций много точечных замен, микроделаций и микроинсерций. Для полного скрининга мутаций в гене ATP7B применяют ПЦР-амплификацию всех экзонов вместе с последовательностями интронов, которые отвечают за прохождение сплайсинга. После этого проводят конформационный анализ ПЦР-продуктов с последующим секвенированием тех фрагментов ДНК, конформация которых оказалась аномальной. Другой диагностический подход предусматривает проведение реакции обратной транскрипции и анализ полноразмерной к-ДНК этого гена. При этом получают при помощи ПЦР перекрывающиеся копии отдельных участков к-ДНК, а затем проводят конформационный анализ и секвенирование.

Болезнь Гоше. Болезнь Гоше представляет собой тяжелую наследственную патологию и развивается при недостаточной активности фермента бета-глюкоцереброзидазы, который участвует в гидролизе глюкоцереброзида на глюкозу и церамид. В результате этого происходит накопление глюкоцереброзида в лизосомах макрофагов. Болезнь Гоше наследуется по аутосомно-рецессивному типу и возникает из-за дефектов гена

GBA, который расположен в хромосомном локусе 1q21. На сегодняшний день известно свыше 150 различных мутаций этого гена. Среди евреев Ашкенази распространена точечная мутация, которая приводит к аминокислотной замене L444P. При этом нуклеотид Т в последовательности CCTGG заменяется на С и возникает новый сайт CCGG, который может распознаваться рестриктазой Nci I. Для выявления этой мутации при помощи ПЦР копируют участок гена, содержащий этот сайт, и полученный фрагмент ДНК подвергают гидролизу данной рестриктазой (ПДРФ-анализ). Расщепляется только тот фрагмент, который соответствует мутантному аллелю гена GBA. Эта мутация вместе с тремя другими (N370S, 84GG, IVS2+1) составляет 90% дефектных вариантов гена GBA в популяции евреев Ашкенази. В других популяциях вклад этих мутаций составляет 50-60%. В этих популяциях при болезни Гоше перечисленные мутации обычно сочетаются с более редкими (V394L, D409H, D409V, R463C, R463H, R496H, а также выпадение участка из 55 нуклеотидов из 9 экзона, который пересекается с сайтом мутации N370S). Молекулярную диагностику этих мутаций проводят при помощи ПЦР в комбинации с применением рестриктаз или с применением сайт-специфических праймеров. Делеции и инсерции анализируют по изменению размеров ПЦР-продуктов. Если у больного находят только одну мутацию, то для поиска второго генетического дефекта исследуют все прочие экзоны гена, используя при этом метод секвенирования.

Молекулярная диагностика гемобластозов.

Молекулярно-биологические методы применяются для установления диагноза, составления прогноза, оценки эффективности и определения тактики лечения гемобластозов. Результаты исследований, проведенных при помощи молекулярных методов, не противоречат, но существенно дополняют канонические цитоморфологические и цитохимические критерии диагностики. Аномальный иммунофенотип определяют при помощи проточной цитофлуориметрии. Использование широкой панели антител дает возможность определить природу опухолевых клеток, установить правильный диагноз, без чего невозможно проведение адекватного лечения. Кроме того, проточная цитофлуориметрия применяется и для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ).

Классические методы цитогенетического анализа позволяют получить неоценимую информацию при установлении диагноза в дебюте заболевания. Диагностика гемобластозов стала более надежной с появлением специфических молекулярных зондов, при помощи которых можно проводить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) и выявлять хромосомные aberrации даже в неделящихся клетках. Кроме того, метод FISH позволяет с высокой чувствительностью обнаруживать остаточные опухолевые клетки, что крайне необходимо при мониторинге МОБ.

Применение молекулярных методов - в особенности метода ПЦР - для диагностики гемобластозов стало возможным в результате накопления данных о молекулярных механизмах возникновения этих заболеваний. В настоящее время охарактеризованы многие генетические дефекты, которые приводят к неопластической трансформации кроветворных клеток. Были исследованы на молекулярном уровне области слияния материала разных хромосом, которые

обмениваются своими частями в результате многочисленных повторяющихся транслокаций – маркеров гемобластозов, которые ранее были исследованы и классифицированы с помощью цитогенетических методов.

Оказалось, что существуют два принципиально разных варианта структурных перестроек как в случае транслокаций, так и инверсий. Так, некоторые гены оказываются вблизи точек разрыва и приобретают порой такое новое соседство, которое коренным образом изменяет характер их работы, но структура таких генов обычно остается прежней. Если же разрыв происходит внутри самих генов, то на сцену выходят гены-химеры, получающиеся в результате слияния без сдвига рамки считывания последовательностей разных генов. Таким образом, в первом случае не возникает слитых между собой генов, они только пространственно сближаются, а малигнизация клеток зависит от количественных параметров работы таких генов и их взаимного влияния. Во втором случае образуется слитный новый ген, сохраняющий лишь некоторые важные черты своих предшественников.

Молекулярная диагностика онкомаркеров, которые активируются при гемобластозах одним из двух описанных выше способов, проводится по-разному.

В первом случае диагностику при помощи метода ПЦР проводят на основе данных о структуре геномных точек разрыва, если они возникают у разных больных в пределах разрешающей способности метода ПЦР, определяемой максимальным размером фрагмента ДНК, который может синтезировать полимеразы. В этом случае анализируемым материалом является препарат геномной ДНК, выделенной из клеток костного мозга или периферической крови пациентов. Кроме того, диагностику можно осуществлять, определяя уровень экспрессии того онкогена, который структурно не изменился, но в процессе хромосомных перестроек оказался гиперэкспрессированным в результате сближения его промоторной области с энхансером гена, который в норме был расположен в другой хромосоме. Для количественной оценки уровня экспрессии таких онкомаркеров применяют метод ПЦР в реальном времени. При этом в качестве исследуемого материала используют тотальную РНК, выделенную из клеток костного мозга или периферической крови пациентов. При помощи фермента обратной транскриптазы (ОТ) РНК превращается в к-ДНК, которая затем служит матрицей в реакции ПЦР в реальном времени. Способ количественной оценки зависит при этом от того, каким контрольным материалом располагает исследователь. Примером заболевания, при котором происходит активация онкогена, но не меняется организация его структурной части, может служить лимфома Беркитта. При этом малигнизация В-лимфоцитов чаще всего происходит в результате транслокации $t(8;14)(q24;q32)$, возникающей в 90% случаев таких лимфом.

Данная транслокация приводит к сближению гена с-МУС из 8 хромосомы с генами тяжелых цепей иммуноглобулинов (H) из 14 хромосомы. Две другие транслокации $t(2;8)$ и $t(8;22)$, выявляемые при лимфоме Беркитта, приводят к тому, что "ниже" последовательностей гена с-МУС оказываются последовательности генов легких цепей иммуноглобулинов "каппа" и "лямбда" из 2 и 22 хромосом, соответственно. Близость

энхансеров генов цепей иммуноглобулинов ведет к повышенной экспрессии гена *c-MYC*. Молекулярную диагностику этого заболевания проводят по оценке уровня экспрессии гена *c-MYC* и при помощи анализа геномных точек разрыва. При фолликулярной лимфоме в результате транслокации $t(14;18)(q32;21)$ ген *BCL2* из 18q21 активируется в результате сближения с генами тяжелых цепей иммуноглобулинов из 14 хромосомы. У больных некоторыми лимфомами обнаруживают также реципрокную транслокацию $t(11;14)$, при которой происходит активация гена циклина *D1 (PRAD1)* из 11q13 под воздействием энхансера генов тяжелых цепей иммуноглобулинов из 14q32. Острые Т-клеточные лимфолейкозы (Т-ОЛЛ) бывают связаны с несколькими разными транслокациями, при которых происходит активация генов факторов транскрипции путем сближения с генами иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов. Например, ген *NOX11*, локализованный в 10 хромосоме, активируется при некоторых Т-ОЛЛ в результате транслокаций $t(10;14)(q24;q11)$ и $t(7;10)(q35;q24)$ (активация генами рецепторов Т-клеток из 14 и 7 хромосом - альфа и бета, соответственно). В ряде случаев Т-ОЛЛ ген *TAL1(SCL)* активируется энхансерами генов иммуноглобулинов в результате транслокации $t(1;14)$. Кроме того, при Т-ОЛЛ может наблюдаться гиперэкспрессия гена *RBTN(TTG)* из 11 хромосомы при активации генами рецепторов Т-лимфоцитов при транслокациях $t(11;14)(p13;q11)$ и $t(11;14)(p15;q11)$. Активация прото-онкогенов, приводящих к развитию гемобластозов, может осуществляться не только путем сближения с кодирующими последовательностями генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов, но и с другими генами. Например, активация гена *EVI1* несет ответственность за развитие 2% случаев ОМЛ и МДС. Ген *EVI1* лежит в длинном плече 3 хромосомы и активируется при $inv(3)(q21q26)$, а также при $t(3;3)(q21;q26)$. Показано, что эта активация вызывается сближением *EVI1* с геном белка рибофорина 1, лежащего в другом локусе той же 3 хромосомы. Во всех перечисленных случаях молекулярная диагностика возможна при помощи количественной оценки уровня экспрессии активированных генов при помощи метода ПЦР в реальном времени. При втором варианте активации прото-онкогенов, вызывающих развитие гемобластозов, происходит существенная структурная перестройка, в результате которой возникают химерные онкогены. Структурные особенности химерных онкогенов – маркеров гемобластозов определяют тактику проведения молекулярной диагностики. Как правило, в этих случаях рутинная диагностика при помощи ПЦР-амплификации областей геномной ДНК, содержащих точки разрыва, оказывается невозможна, так как геномные точки разрыва индивидуальны для разных больных и возникают случайных местах обширных интронных последовательностей. Клонирование и изучение геномных точек разрыва у таких больных до сих пор граничит с искусством, используется исключительно при проведении фундаментальных исследований и не применяется для целей диагностики. Редким исключением является микроделеция гена *TAL1(SCL)*, которая встречается в 25% детских Т-ОЛЛ (выше мы обсуждали другой вариант активации этого гена, основанный не на структурной перестройке, а на сближении с энхансерами генов тяжелых цепей иммуноглобулинов). Некоторые геномные точки разрыва при этой микроделеции можно выявлять с целью диагностики при помощи ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК. При созревании м-РНК химерных онкогенов большое разнообразие, существующее на уровне геномных точек разрыва у разных больных, несущих одну и ту же

хромосомную перестройку, нивелируется за счет природного механизма – сплайсинга. В итоге все сводится к образованию нескольких основных вариантов зрелой м-РНК химерного онкогена, которые могут выявляться у разных больных. В настоящее время диагностику химерных онкогенов при гемобластозах проводят не по геномной ДНК, а по детекции точек слияния экзонов генов-партнеров, которые участвуют в образовании химерного онкогена. Для этого используют метод обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), чувствительность которой позволяет выявлять даже 1 опухолевую клетку среди 10000 - 1000000 нормальных (чувствительность 10^{-4} – 10^{-6}). При этом всего две или три системы праймеров позволяют исследователю при помощи ОТ-ПЦР проводить определение основных вариантов того или иного химерного онкогена. Например, при помощи двух систем праймеров можно выявлять при помощи ОТ-ПЦР два основных типа м-РНК химерного онкогена PML/RAR α (варианты bcr3 и bcr1), а также редкий вариант bcr2 PML/RAR α (при помощи той же диагностической системы, которую применяют для обнаружения варианта bcr1). Таким же образом при помощи метода ОТ-ПЦР проводят диагностику химерных онкогенов BCR/ABL типов p190 и p210 (разные виды транслокации t(9;22) - маркеры для ОЛЛ и ХМЛ); MLL/AF9, MLL/AF4, MLL/ENL (t(9;11), t(4;11), t(11;19) - маркеры ОЛЛ); E2A/PBX1, SIL/TAL1, TEL/AML1 (t(1;19), del(1)(p32;p32), t(12;21) - маркеры ОЛЛ); AML1/EVI1, AML1/ETO, CBFB/MYH11 (t(3;21), t(8;21), inv(16;16) - маркеры ОМЛ). Обнаружение у пациента методом ОТ-ПЦР характерного химерного онкомаркера служит основанием для постановки соответствующего диагноза. Последующие определения экспрессии этого онкомаркера у данного пациента в костном мозге или периферической крови позволяют оценить эффективность лечения. При некоторых нозологиях, например, при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) и остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ), проводимое лечение может привести к полному исчезновению молекулярного сигнала при том же высоком уровне чувствительности диагностики с помощью метода ОТ-ПЦР. В этом случае говорят о достижении молекулярной ремиссии. Последующий мониторинг тем же методом позволяет вовремя зафиксировать момент молекулярного рецидива, когда вновь будет выявляться экспрессия химерного онкогена, причем до наступления цитогенетического и гематологического рецидива. Эта информация дает возможность провести упреждающее терапевтическое воздействие и предотвратить развитие гематологического рецидива. Сочетание современных методов терапии лейкозов, позволяющих достичь молекулярной ремиссии, и высокочувствительной молекулярной диагностики стимулирует поиск эффективных способов лечения молекулярных рецидивов.

Обычный метод ОТ-ПЦР, который дает только качественную информацию о наличии или отсутствии экспрессии химерных онкогенов, все больше уступает место сочетанию обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР в реальном времени (RQ PCR). При помощи RQ PCR можно определить, с какой скоростью и какой глубины достигает снижение молекулярного сигнала, соответствующего экспрессии онкомаркера и связанного с изменением в процессе лечения объема опухолевой массы. Чувствительность этого метода сравнима с чувствительностью ОТ-ПЦР, но при этом RQ PCR позволяет оценить количественно динамику убывания/роста опухолевого клона даже при полном цитогенетическом ответе. Скорость и амплитуда снижения/нарастания

молекулярного сигнала, полученного при помощи RQ PCR, становятся одними из главных показателей эффективности лечения лейкозов. Большое разнообразие видов лейкозов затрудняет проведение эффективного мониторинга МОБ, так как не всегда удается выявить для конкретного пациента уникальный опухолевый маркер. В связи с этим весьма перспективным представляется внедрение в диагностическую практику методов оценки МОБ по анализу универсальных опухолевых маркеров. Одним из наиболее предпочтительных универсальных маркеров гемобластозов на сегодняшний день является онкомаркер WT1. Перспективным маркером является также онкомаркер PRAME, с которым связаны некоторые особенности клинических проявлений лейкозов.

Ценную прогностическую информацию для лечения гемобластозов можно получить, если параллельно с определением основного маркера анализировать при помощи молекулярно-биологических методов изменение работы некоторых других генов. Показано, что при диагностике ОПЛ целесообразно исследовать не только основной маркер PML/RARa, но и оценивать повышение уровня экспрессии и определять частичную дупликацию гена FLT3, – факторы неблагоприятного прогноза. При ОЛЛ и ОМЛ неблагоприятным прогностическим маркером является частичная дупликация гена MLL, выявляемая при помощи ОТ-ПЦР. Молекулярная диагностика эритремии оказывается более надежной, если не только оценивать при помощи метода ПЦР в реальном времени гиперэкспрессию гена PRV-1, но и определять ассоциированную с этим заболеванием точечную мутацию гена Jak-киназы. Очень эффективен мониторинг минимальной остаточной болезни опухолей лимфатической природы с помощью анализа уникальных перестроек генов иммуноглобулинов и T-клеточных рецепторов. Успех пересадки стволовых клеток при лечении гемобластозов во многом зависит от молекулярного анализа приживления клеток донора и поведения остаточных клеток реципиента. При этом можно оценивать поведение опухолевого клона по анализу характерного маркера, если он был выявлен до проведения трансплантации. Но даже при отсутствии такого маркера, клетки донора и реципиента можно различить при помощи молекулярного анализа мультиаллельных STR- и VNTR- полиморфизмов, которые используются также в качестве косвенных маркеров при семейном анализе наследственных патологий и для идентификации личности.