

**СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ И
ПИРОСЕКВИНИРОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКОЙ МУТАЦИИ
V617F В ГЕНЕ ЯНУС-КИНАЗЫ – 2**

Ануфриева Е.Е.,

**научный руководитель канд. биол. наук Субботина Т.Н., канд. мед. наук
Ольховский И.А., канд. биол. наук Титова Н.М.**

Сибирский федеральный университет

*Красноярский филиал гематологического научного центра
Минздрав России*

Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) – это группа гематологических заболеваний, сопровождающихся опухолевой трансформацией с последующей пролиферацией миелоидных клеток, длительно сохраняющих способность к дифференцировке. В 2005 году была открыта точечная соматическая мутация (Jak2V617F) в гене Янус-киназы-2 (Jak2), которая приводит к замене валина на фенилаланин в положении 617 и вызывает нарушение структуры тирозинкиназы, сближение киназных доменов, их самоактивацию и появление высокой активности тирозинкиназы, что приводит к усилению пролиферации клетки и блокаде процессов апоптоза. Постоянная активации Jak2 вне зависимости от связывания цитокинового рецептора со своим лигандом вызывает увеличение числа зрелых клеток всех миелоидных ростков кроветворения. Определение данной мутации имеет решающее значение для диагностики и мониторинга терапии истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза. Jak2 V617F мутационный статус и его аллельная нагрузка коррелируют с клинико-гематологической картиной больных эссенциальной тромбоцитемией, при этом наблюдается увеличение количества нейтрофилов, большая скорость тромбообразования и интенсивное развитие миелофиброза. В связи с этим актуально определять данную мутацию не только качественными методами, позволяющими интерпретировать результат как наличие или же отсутствие мутации, но и количественными методами, позволяющими определить аллельную нагрузку.

Целью работы явилось качественное выявление наличия мутации V617F в гене янус-киназы – 2 у пациентов с подозрением на хроническое миелопролиферативное заболевание и сопоставление полученных результатов с данными об относительном количестве мутантного аллеля.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови реагентами «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ Литех) и «ДНК – сорб - В» (Амплисенс). Качественный анализ наличия или отсутствия мутации в гене Jak2 проводили с помощью комплекта реагентов для амплификации «SNP-экспресс-РВ» (НПФ Литех). В данном случае продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) детектировались в режиме реального времени на амплификаторе iCycler iQ5 (BioRad). Разработчики предлагают схему интерпретации анализа соматической мутации аналогичную для наследственных мутаций, присутствующих во всех клетках. Результаты анализа позволяют дать три типа заключений: гомозигота по нормальной аллели; гетерозигота и гомозигота по патологической аллели. Анализ осуществляется по кривым накопления фонового сигнала от каждого образца. Для гетерозиготного образца с наследственной мутацией разница циклов выхода кривых накопления флуоресцентного продукта с нормальным и мутантным вариантом должна быть меньше, либо равна 1,5. Количественный анализ проводили методом пиросеквенирования с применением системы генетического

анализа серии PyroMark «АмплиСенс Пироскрин» на приборе пиросеквенатор PyroMark™ Q24 (Qiagen).

В ходе проведённой работы было обследовано 129 пациентов с подозрением на ХМПЗ, из них у 39 обнаружена мутация. Было проведено сопоставление числа тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов у обследованных пациентов и наличия мутации V617F в гене Jak2. По литературным данным мутация определяется в 90–95 % случаев истинной полицитемии, 50–70 % случаев эссенциальной тромбоцитемии и 40–50 % случаев миелофиброза. В нашем исследовании встречаемость мутации среди пациентов с повышенным числом клеток крови всех трех клеточных линий, что характерно для диагноза истинная полицитемия, составила 93%. Обследование здоровых добровольцев (25 человек) и пациентов с количеством клеток ниже нормы (21 человек), не выявило мутации, что соответствует ожидаемому результату, так как мутация приводит к увеличению числа клеток всех трех клеточных линий.

При анализе данной соматической мутации методом ПР-РВ мы столкнулись с примерами, когда разница циклов составляла 1,68; 1,88; 2,2, то есть более 1,5, но была все же достаточно мала, что свидетельствует о наличии клеток, несущих мутацию. Во всех описанных случаях невозможно было однозначно интерпретировать полученные результаты. В связи с этим, далее нами были отобраны 39 образцов, определённых вышеуказанным тестом как сомнительные гетерозиготы, гетерозиготы и гомозиготы по мутантному аллелю (разница циклов составила от 1,68 до 4) и проведен их количественный анализ на предмет выявления относительного содержания (в %) мутантного аллеля методом пиросеквенирования. Далее мы оценивали зависимость разницы между циклами выхода кривых накопления флуоресценции при проведении метода ПЦР-РВ и аллельной нагрузкой, определённой с помощью технологии пиросеквенирования. Из значения цикла выхода мутантного аллеля вычитали значение цикла выхода нормального (рис.1).

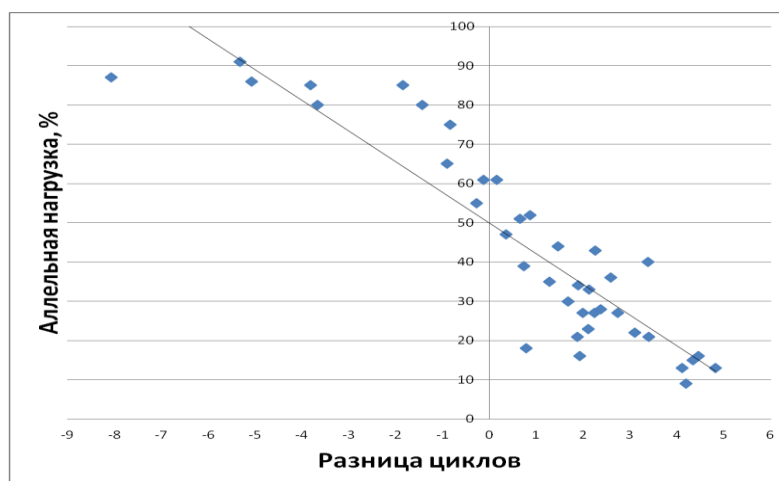


Рисунок 1 - Зависимость разницы циклов выхода кривых флуоресценции от процента аллельной нагрузки.

Коэффициент ранговой корреляция Спирмена составил -0,88, $P < 0,05$ таким образом, получена статистически значимая корреляционная связь между разницей циклов выхода кривых и процентом аллельной нагрузки. Регрессионное уравнение: $y = -7,8 * x + 49,7$, где y - процент аллельной нагрузки, x - разница между циклами выхода кривой флуоресценции. Таким образом, метод ПЦР-РВ (Литех) лишь приблизительно может быть использован для интерпретации результатов анализа мутации Jak2V617F в гене Янус-киназы-2.