

Медико-биологические проблемы жизнедеятельности

Научно-практический рецензируемый журнал

№ 1(7)

2012 г.

Учредитель

Государственное учреждение
«Республиканский научно-
практический центр
радиационной медицины
и экологии человека»

Журнал включен в Перечень
научных изданий Республики
Беларусь для опубликования
диссертационных исследова-
ний по медицинской и био-
логической отраслям науки
(31.12.2009, протокол 25/1)

Журнал зарегистрирован

Министерством информации
Республики Беларусь,
Свид. № 762 от 6.11.2009

Компьютерная верстка
А.А. Гурин

Подписано в печать 12.04.12.
Формат 60×90/8. Бумага офсетная.
Гарнитура «Times New Roman».
Печать цифровая. Тираж 215 экз.
Усл. печ. л. 14,2. Уч.-изд. л. 8,33.
Зак. 1060.

Издатель ГУ «Республиканский
научно-практический центр
радиационной медицины и экологии
человека»
ЛИ № 0230/0131895 от 3.01.2007 г.

Отпечатано в Филиале БОРБИЦ
РНИУП «Институт радиологии».
220112, г. Минск,
ул. Шпилевского, 59, помещение 7Н

ISSN 2074-2088

Главный редактор

А.В. Рожко (д.м.н., доцент)

Редакционная коллегия

В.С. Аверин (д.б.н., зам. гл. редактора), В.В. Аничкин (д.м.н., профессор), В.Н. Беляковский (д.м.н., профессор), Ю.В. Висенберг (к.б.н., отв. секретарь), Н.Г. Власова (к.б.н., доцент), А.В. Величко (к.м.н., доцент), В.В. Евсеенко (к.п.с.н.), С.А. Игумнов (д.м.н., профессор), А.В. Коротяев (к.м.н.), Н.Б. Кривелевич (к.м.н.), А.Н. Лызигов (д.м.н., профессор), А.В. Макарович (к.м.н., доцент), С.Б. Мельнов (д.б.н., профессор), Э.А. Надыров (к.м.н., доцент), И.А. Новикова (д.м.н., профессор), Э.Н. Платошкин (к.м.н., доцент), Ю.И. Рожко (к.м.н.), Г.Н. Романов (к.м.н.), А.М. Скрыбин (к.м.н.), А.Е. Силян (к.б.н.), А.Н. Стожаров (д.б.н., профессор), О.В. Черныш (к.м.н.), Н.И. Шевченко (к.б.н.), А.Н. Цуканов (к.м.н.)

Редакционный совет

А.В. Аксеев (д.м.н., профессор, Челябинск), С.С. Алексанин (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Д.А. Базыка (д.м.н., профессор, Киев), А.П. Бирюков (д.м.н., профессор, Москва), А.Ю. Бушманов (д.м.н., профессор, Москва), И.И. Дедов (д.м.н., академик РАМН, Москва), Ю.Е. Демидчик (д.м.н., член-корреспондент НАН РБ, Минск), М.П. Захарченко (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Л.А. Ильин (д.м.н., академик РАМН, Москва), Я.Э. Кенигсберг (д.б.н., профессор, Минск), К.В. Котенко (д.м.н., профессор, Москва), В.Ю. Кравцов (д.б.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Г. Кручинский (д.м.н., Минск), Т.В. Мохорт (д.м.н., профессор, Минск), Д.Л. Пиневиц (Минск), В.Ю. Рыбников (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), В.П. Сытый (д.м.н., профессор, Минск), Н.Д. Тронько (д.м.н., профессор, Киев), В.П. Филонов (д.м.н., профессор), В.А. Филонюк (к.м.н., доцент, Минск), А.Ф. Цыб (д.м.н., академик РАМН, Обнинск), В.Е. Шевчук (к.м.н., Минск)

Технический редактор

С.Н. Никонович

Адрес редакции

246040 г. Гомель, ул. Ильича, д. 290,
ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», редакция журнала
тел (0232) 38-95-00, факс (0232) 37-80-97
<http://www.mbp.rcrm.by> e-mail: mbp@rcrm.by

© Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический
центр радиационной медицины и
экологии человека», 2012

№ 1(7)

2012

Medical and Biological Problems of Life Activity

Scientific and Practical Journal

Founder

Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

Journal registration
by the Ministry of information
of Republic of Belarus

Certificate № 762 of 6.11.2009

© Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

ISSN 2074-2088

Обзоры и проблемные статьи

- А.И. Муравьев, Г.М. Румянцева, Т.М. Левина* Принципы и формы реабилитации больных, страдающих умственной отсталостью и органическими психическими расстройствами 6

Медико-биологические проблемы

- В.Ф. Горобец* Заболеваемость тиреопатиями в допубертатный период детей из Калужской области, облученных вследствие инкорпорации техногенного ^{131}I на неонатальном и раннем грудном этапе развития 11

- О.А. Емельянова, В.А. Кириллов* Классификация тиреоидной опухоли фолликулярного строения с помощью морфометрии 18

- Б.О. Кабешев, Д.Н. Бонцевич, А.Ю. Васильков, Н.И. Шевченко, Э.А. Надыров* Антибактериальные и физические свойства шовного материала, на основе полиамида, модифицированного наночастицами серебра 25

- А.В. Рожко, В.Б. Масыкин, Э.А. Надыров, Н.Г. Власова, И.Г. Савастеева, А.Е. Океанов* Заболеваемость раком щитовидной железы населения, пострадавшего в результате катастрофы на Чернобыльской АЭС 31

- А.Е. Силин, Ж.М. Козич, В.К. Шпудейко, И.Б. Тропашко, В.Н. Мартинков, А.А. Силина, С.М. Мартыненко, А.В. Воропаева* Молекулярно-генетическая характеристика миелодиспластического синдрома и острого нелимфобластного лейкоза у взрослых пациентов при первичном тестировании и в ходе лечения 38

- С.А. Ушков, В.В. Шевляков* Гигиеническая регламентация крупной пыли и обоснование единой предельно допустимой концентрации в воздухе рабочей зоны пыли зерно-растительного происхождения 47

Reviews and problem articles

- A. Muraviev, G. Roumyantseva, T. Levina* Principles and forms of patients' rehabilitation with mental retardation and organic mental disorders

Medical-biological problems

- V.F. Gorobets* Incidence of thyroid diseases in the period before puberty at the Kaluga oblast children irradiated owing to technogenic ^{131}I incorporation on neonatal and early breast-feeding stage

- O.A. Emeliyanova, V. A. Kirillov* Classification of thyroid follicular tumors by morphometry

- B.O. Kabeshev, D.N. Bontsevich, A.Iu. Vasil'kov, N.I. Shevchenko, E.A. Nadyrov* Antibacterial and physical properties of polyamide-based surgical suture material, modified by nanoparticles

- A.V. Rozhko, V.B. Masyakin, E.A. Nadyrov, N.G. Vlasova, I.G. Savasteeva, A.E. Okeanov* The thyroid cancer incidence in the population of the Republic of Belarus affected by the Chernobyl accident

- A.E. Silin, Zh.M. Kozich, V.K. Shpudeyko, I.B. Tropashko, V.N. Martinkov, A.A. Silina, S.M. Martynenko, A.V. Voropayeva* Molecular and genetic description of myelodysplastic syndrome and acute nonlymphoblastic leukemia in adult patients during primary testing and treatment

- S. Ushkov, V. Shevlaykov* Hygienic regulation of groats dust and justification of a unified maximum permissible concentration in the air of working area of a grain-vegetable origin dust

Клиническая медицина

И.А. Корбут Прогнозирование реализации врожденной инфекции у родильниц Гомельской области при повышенном перинатальном риске 54

Т.И. Ровбутъ, П. Гутковский, Н.В. Томчик Влияние социальных и экологических факторов на функцию внешнего дыхания у детей 62

Г.Н. Романов, Л.Е. Доморацкая, Т.И. Москвичева, Н.Ф. Чернова, Э.В. Руденко Оценка обеспеченности витамином Д у пациентов с остеопорозом в возрасте старше 50 лет, проживающих в Гомельской области 69

Т.В. Суворцева, Н.М. Калинина, В.Ю. Кравцов, Н.И. Давыдова, Л.В. Чиненова, Н.В. Ибрагимова, Ю.А. Грухин Интерлейкин-8 и фактор некроза опухоли- α в генитальном тракте у пациенток с HP-ассоциированными кислотозависимыми заболеваниями после антихеликобактерной терапии. Сообщение 1 76

Т.В. Суворцева, Н.М. Калинина, В.Ю. Кравцов, Н.И. Давыдова, Л.В. Чиненова, В.М. Пономаренко, Ю.А. Грухин Интерлейкин-8 и фактор некроза опухоли- α в генитальном тракте у пациенток с HP-ассоциированными кислотозависимыми заболеваниями после антихеликобактерной терапии. Сообщение 2 84

Ю.В. Сытый Предикторы риска развития интракраниального кровоизлияния аневризматического генеза по данным компьютерно-томографической ангиографии 90

А.Е. Филюстин, А.М. Юрковский, А.А. Гончар Дистрофические изменения межпозвонковых дисков и морфометрические параметры замыкающих пластинок поясничных позвонков 99

Clinical medicine

I.A. Korbut Prediction of realization of the congenital infection at high perinatal risk women of Gomel region

T. Rovbuts, P. Gutkowski, N. Tomchik Influence of social and adverse factors of the environment on function of external breath in children

G.N. Romanov, L.E. Domoratskaya, T.I. Moskvicheva, N.F. Chernova, E.V. Rudenko Evaluation of vitamin D status in osteoporotic patients over 50 years living in the Gomel region

T.V. Sourovvtseva, N.M. Kalinina, V.Iu. Kravtsov, N.V. Davydova, L.V. Tchinionova, N.V. Ibragimova, Iu.A. Groukhin IL-8 and TNF- α in female genital tract of patients with HP-associated acid-related diseases after helicobacter eradication therapy. Report 1

T.V. Sourovvtseva, N.M. Kalinina, V.Iu. Kravtsov, N.V. Davydova, L.V. Tchinionova, V.M. Ponomarenko, Iu.A. Groukhin IL-8 and TNF- α in peripheral blood of patients with HP-associated acid-related diseases after helicobacter eradication therapy. Report 2

Yu.V. Syty Predictors of development risk of intracranial haemorrhage aneurysmal genesis by data computed tomographic angiography

A.E. Filiustsin, A.M. Yurkovskiy, A.A. Gontshar The disc degeneration and vertebral endplate

И.М. Хмара, Н.А. Васильева, Ю.Н. Бойко, С.М. Чайковский Композиция тела детей с различным весом 104

Н.Б. Холодова, Л.А. Жаворонкова, Б.Н. Рыжов Неврологические, нейропсихологические и нейрофизиологические проявления преждевременного старения у участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС 112

Обмен опытом

С.В. Лещёва, Р.И. Гракович, А.А. Валетко, Н.Г. Власова Государственный дозиметрический регистр: дозы облучения персонала Республики Беларусь в условиях нормальной эксплуатации техногенных источников ионизирующего излучения 121

I.M. Khmara, N.A. Vasileva, J.N. Boyko, S.M. Tchaikovsky Body composition of children with different weight

N.B. Kholodova, L.A. Zhavoronkova, B.N. Ryzhov Neurological, neuropsychological and neurophysiological manifestations of premature aging among participants of liquidation consequences of the Chernobyl accident

Experience exchange

S.V. Lescheva, R.I. Gracovich, A.A. Valetko, N.G. Vlasova The State Dosimetry Register: doses of personnel of Belarus in conditions of normal operation of antropogenic sources of ionized irradiation

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА И ОСТРОГО
НЕЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ
ПРИ ПЕРВИЧНОМ ТЕСТИРОВАНИИ И В ХОДЕ ЛЕЧЕНИЯ**

ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Беларусь

В результате молекулярно-генетического анализа образцов ДНК у 18 пациентов с миелодиспластическим синдромом, вариант рефрактерная анемия с избытком бластов, и 65 пациентов с различными вариантами острого нелимфобластного лейкоза определены частоты встречаемости мутаций генов FLT3 и NPM1 в каждой из подгрупп исследования. В группе пациентов с МДС РАИБ был выявлен один случай мутации гена NPM1 ($5,6 \pm 5,4\%$). В группе пациентов с ОНЛЛ мутации FLT3-ITD были выявлены у $26,2 \pm 5,5\%$ пациентов, мутация гена NPM1 – у $18,5 \pm 4,8\%$ пациентов, а FLT3 D835 – у $4,6 \pm 2,6\%$ пациентов. В большинстве случаев мутация гена NPM1 выявлялась совместно с FLT3-ITD. Наиболее часто мутации FLT3-ITD выявлялись в подгруппе М3, а мутации NPM1 – в подгруппе М1.

Показана потенциальная возможность использования выявленных мутаций в качестве генетических маркеров прогноза и эффективности проводимой терапии. Для получения более точной оценки значимости данных маркеров требуется продолжение исследований с увеличением количества наблюдаемых случаев и периода наблюдения.

Ключевые слова: миелодиспластический синдром, острый нелимфобластный лейкоз, FLT3-ITD, FLT3 D835, NPM1, полимеразная цепная реакция

Введение

Одними из наиболее важных факторов прогноза, отражающих биологические особенности острого нелимфобластного лейкоза (ОНЛЛ) и учитываемых в большинстве современных программ терапии, являются цитогенетические особенности лейкемических клеток. В то же время около половины случаев ОНЛЛ составляют больные с нормальным кариотипом, которые традиционно относятся к подгруппе с промежуточным прогнозом. Проведенные исследования показывают, что фенотипически данная группа является гетерогенной и может быть разделена на прогностически различные подгруппы. В этой связи в последнее время актуальным является поиск нарушений генома с участием генов, мутации которых играют важную роль в патогенезе ОНЛЛ, особен-

но в группе пациентов без видимых хромосомных aberrаций.

Исследования последних лет позволили выявить ряд молекулярных событий, сопровождающих ОНЛЛ. Среди них особое место принадлежит мутациям генов FLT3 и NPM1 [1-6]. Клинически значимые мутации гена FLT3 представляют собой внутренние tandemные повторы (internal tandem duplication, ITD) длиной от 3 до более чем 400 пар оснований в пределах юкстамембранного домена, а также точковые мутации в киназном домене, среди которых наиболее частой является замена нуклеотидов в 835-ом кодоне (D835). По результатам ряда исследований указанные мутации гена FLT3 являются фактором неблагоприятного прогноза [6, 7]. Наиболее частой мутацией NPM1 при ОНЛЛ является дупликация четырех нуклеотидов в

12 экзоне. Наличие мутаций NPM1, как правило, ассоциируется с благоприятным течением ОНЛЛ за исключением случаев ассоциации с мутациями гена FLT3 [4].

Целью данной работы является изучение индивидуальной и сочетанной распространенности мутаций генов FLT3 и NPM1 в группе пациентов с МДС РАИБ и различными формами ОНЛЛ и мониторинг данных мутаций в процессе лечения для оценки возможности использования их в качестве маркеров прогноза и эффективности лечения.

Материал и методы исследования

Группа исследования и пробоподготовка. Сформирована группа исследования из 83 пациентов гематологического отделения для взрослых ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». В группу включены 18 пациентов с миелодиспластическим синдромом (МДС), вариант рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ): 11 мужчин (средний возраст 61,1 года) и 7 женщин (средний возраст 60,7 лет), а также 65 пациентов с различными вариантами ОНЛЛ (M0-M4 по FAB-классификации): 27 мужчин (средний возраст 55,3 лет) и 38 женщин (средний возраст 50,9 лет). Группа пациентов с ОНЛЛ включает 5 случаев острого раннего миелобластного лейкоза (M0), 23 случая острого миелобластного лейкоза (M1), 15 случаев острого миелобластного лейкоза с частичным созреванием (M2), 12 случаев острого промиелоцитарного лейкоза (M3) и 10 случаев острого миеломонобластного лейкоза (M4).

Выделение ДНК из образцов цельной венозной крови осуществлялось посредством набора реагентов «ДНК Сорб-В» (производство ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Выделение ДНК из образцов костного мозга осуществляли с помощью

набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Забор образцов костного мозга и крови осуществлялся только после подписания пациентом формы информированного согласия на участие в исследовании.

Методика выявления мутаций генов FLT3 и NPM1. Выявление исследуемых мутаций осуществлялось посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим электрофоретическим фракционированием продуктов амплификации в агарозном геле.

Для амплификации фрагментов ДНК, в пределах которых локализованы исследуемые мутации, были использованы три пары олигонуклеотидных праймеров (таблица 1).

Для детекции внутренних tandemных повторов (FLT3-ITD) использовались праймеры FLT3-14F и FLT3-15R, мутации D835 – D835-F и D835-R, дупликаций гена NPM1 – NPM-I11f и NPM-E12r.

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формировалась следующим образом: 2,5 мкл 10x Hot Start ПЦР буфер (200 mM Трис-HCl pH 8,3, 200 mM KCl, 50mM (NH₄)₂SO₄), 1 мкл 10mM смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкM праймера, 3,0 мкл 25mM MgCl₂, 0,1 мкл Hot Start Taq-полимеразы (5ед./мкл), 1 мкл образца ДНК, вода ПЦР-качества до объема 25 мкл. ПЦР осуществляли в амплификаторе GeneAmp 2400 PCR System.

Программа для амплификации фрагмента ДНК в пределах 14-15 экзонов FLT3 (для детекции FLT3-ITD) была следующая: начальная денатурация – 5 мин. при

Таблица 1 – Олигонуклеотидные праймеры для анализа мутаций генов FLT3 и NPM1

Ген	Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5'-3'
FLT3	FLT3-14F	GCAATTAGGTATGAAAGCCAGC
	FLT3-15R	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC
FLT3	D835-F	CCGCCAGGAACGTGCTTG
	D835-R	GCAGCCTCACATTGCCCC
NPM1	NPM-I11f	GTGGTAGAATGAAAAATAGAT
	NPM-E12r	CTTGGCAATAGAACCTGGAC

95°C, затем 40 циклов – 30 сек. денатурация при 95°C, 30 сек. отжиг при 52°C и 30 сек. элонгация при 72°C. В завершении – финальная элонгация 8 мин. при 72°C и охлаждение до 4°C.

Программа для амплификации фрагмента ДНК в пределах 20 экзона FLT3 (для детекции D835) была составлена следующим образом: начальная денатурация – 5 мин. при 95°C, затем 40 циклов – 30 сек. денатурация при 95°C, 30 сек. отжиг при 56°C и 30 сек. элонгация при 72°C. В завершении – финальная элонгация 8 мин. при 72°C и охлаждение до 4°C.

Амплификацию фрагмента 11 интрона и 12 экзона NPM1 проводили по следующей программе: начальная денатурация – 5 мин. при 95°C, затем 10 циклов 10-секундной денатурации при 95°C, отжиг – 10 сек. при 65°C и элонгация 30 сек. при 72°C при уменьшении температуры отжига на 1°C в каждом последующем цикле. Следующие 35 циклов – 10 сек. денатурация при 95°C, 10 сек. отжиг при 55°C и 30 сек. элонгация при 72°C. В завершении – финальная элонгация 8 мин. при 72°C и охлаждение до 4°C.

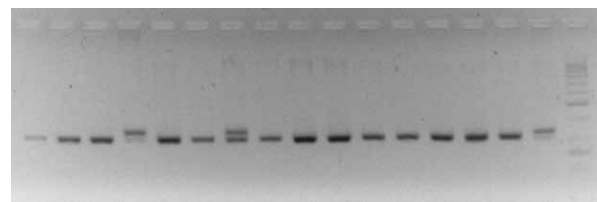
Мутация в 835 кодоне гена FLT3 приводит к разрушению сайта рестрикции, специфического к ферменту *EcoRV*. Это дает возможность осуществлять анализ мутации D835 с использованием метода RFLP-PCR. В нашем случае была использована рестриктаза *EcoRV* производства фирмы Fermentas в комплекте с рестрикционным буферным раствором. Для проведения рестрикции 10 мкл продуктов амплификации смешивали с 20 мкл реакционной смеси, содержащей 5 ед. фермента, и инкубировали в твердотельном термостате при температуре 37°C в течение 3 часов.

Визуализация продуктов ПЦР осуществлялась посредством агарозного гель-электрофореза и окраской бромистым этидием в камере SE-2 (Helicon) с источником питания Эльф-4 (ДНК-технология). Гелевым и электродным буфером был 1x TBE раствор pH 8,0 с 0,05% бромистым этидием. Продукты амплификации объемом 7,5 мкл смешивали с 2,5

мкл загрузочного буфера (70% водный р-р глицерина и 0,05% бромфеноловый синий) и вносили в лунки 2,8% агарозного геля. Электрофорез проводили в течение 30 мин. при 200 В. Маркерами молекулярного веса являлись фрагменты ДНК из набора «GeneRuler 50bp DNA Ladder» (Fermentas), масса которых составляла 50-1000 пар нуклеотидов. Визуализация результатов осуществлялась посредством трансиллюминатора UVT 1 (Biosom) и камеры для фотодокументирования гелей. Примеры электрофоретической детекции соматических мутаций FLT3-ITD и NPM1 представлены на рисунках 1 и 2 (инвертированное изображение).

Результаты исследований

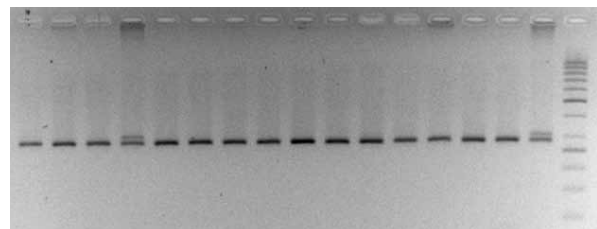
Молекулярно-генетический анализ всех исследованных случаев осуществлял-



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Дорожки 1-3, 5, 6, 8-15 – образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 4, 7 и 16 – образцы, содержащие внутренние тандемные повторы, дорожка 17 – маркер молекулярного веса

Рисунок 1 – Электрофоретическая детекция продуктов амплификации фрагмента гена FLT3 в 2,8% агарозном геле



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Дорожки 1-3, 5-15 – образцы с нормальной последовательностью ДНК; дорожки 4 и 16 – образцы, содержащие мутацию, дорожка 17 – маркер молекулярного веса

Рисунок 2 – Электрофоретическая детекция продуктов амплификации фрагмента гена NPM1 в 2,8% агарозном геле

ся с использованием образцов ДНК, выделенных как из цельной венозной крови, так и из костного мозга. Результаты первичного анализа соматических мутаций генов FLT3 и NPM1 в сформированных группах исследования в процентном выражении представлены на рисунке 3.

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 был выявлен один случай присутствия как в крови, так и в костном мозге мутации гена NPM1. Частота этой мутаций в данной группе составила $5,6 \pm 5,4\%$. Мутации FLT3-ITD и D835 не выявлены. Эти данные подтверждают крайне низкую частоту встречаемости мутаций FLT3 при миелодиспластическом синдроме [8, 9].

В группе пациентов с ОНЛЛ было выявлено 32 случая наличия в крови и/или в костном мозге различных мутаций из числа анализируемых. В 17 случаях ($26,2 \pm 5,5\%$) была выявлена мутация FLT-ITD. У 12 пациентов ($18,5 \pm 4,8\%$) была обнаружена мутация гена NPM1. В клиническом материале 3 пациентов ($4,6 \pm 2,6$) была выявлена мутация D835 гена FLT3. В целом частоты встречаемости изученных мутаций сопоставимы с таковыми, выявленными другими исследователями [10, 11].

Наблюдались различия в составе и частотах встречаемости анализируемых мутаций в различных подгруппах пациентов с ОНЛЛ.

В подгруппе пациентов с M0 по FAB классификации выявлен только один случай присутствия мутации FLT-ITD ($20,0 \pm 17,9\%$). Остальные мутации в данной подгруппе отсутствовали. Однако следует учитывать немногочисленность данной подгруппы, что может повлиять на точность оценки распространенности как выявленной мутации, так и отсутствующих на данном этапе исследования.

Среди 23 пациентов, входящих в подгруппу M1, было выявлено 11 различных мутаций. У четырех пациентов ($17,4 \pm 7,9\%$) определена мутация FLT3-ITD, а в 7 случаях ($30,4 \pm 9,6\%$) – NPM1. Следует отметить, что данная подгруппа оказалась наиболее насыщенной мутациями гена NPM1. При этом в большинстве случаев (четыре случая из семи) данная мутация сочеталась с мутациями FLT3-ITD. Мутация FLT3 D835 у пациентов из данной подгруппы отсутствовала. Этот факт подтверждает ранее полученные данные о том, что среди вариантов M0-M4 подгруппа M1 является наиболее насыщенной мутациями NPM1 [12].

В пределах подгруппы M2, насчитывающей 15 пациентов, выявлены семь

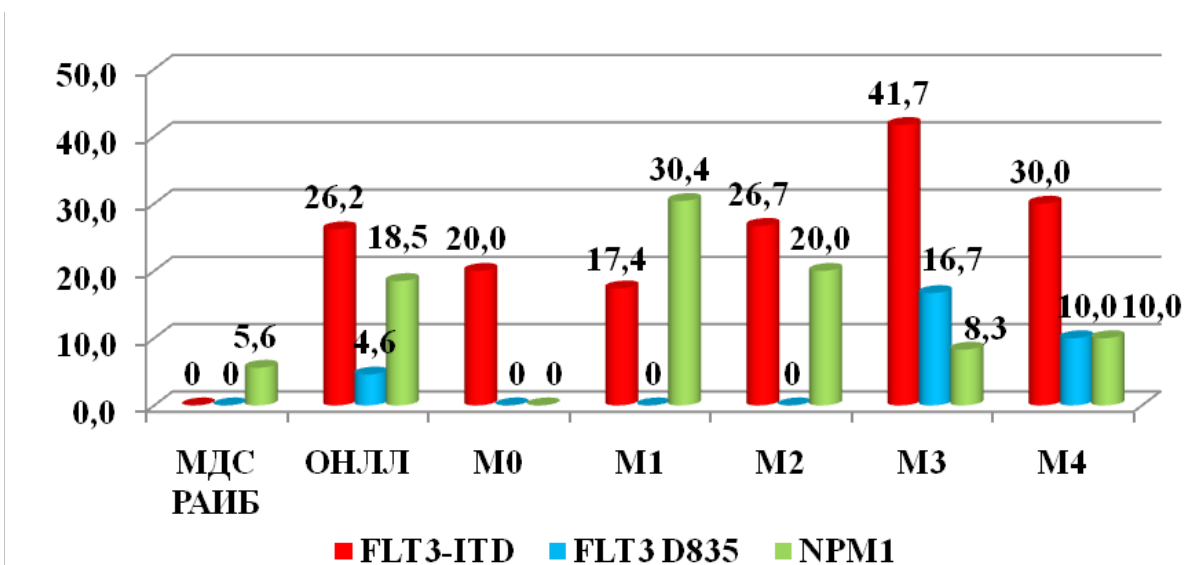


Рисунок 3 – Распространенность мутаций FLT3 и NPM1 в различных группах исследования

случаев мутаций генов FLT3-ITD и NPM1. В четырех случаях ($26,7 \pm 11,4\%$) присутствовала мутация FLT3-ITD, а в 3 случаях ($20,0 \pm 10,3\%$) – мутация гена NPM1. При этом в двух случаях эта мутация сочеталась с FLT3-ITD. Мутация FLT3 D835 в данной подгруппе отсутствовала.

Среди 12 случаев острого промиелоцитарного лейкоза (M3), несмотря на относительно малочисленность данной подгруппы, выявлены все типы анализируемых мутаций. Эта подгруппа оказалась наиболее насыщена мутациями FLT3-ITD, которые присутствовали в $41,7 \pm 14,2\%$ случаев. Выявленное нами преобладание данного типа мутации в группе пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом хорошо согласуется с данными других исследований, согласно которым FLT-ITD преимущественно встречается в группах пациентов с M3 и M1 [13, 14]. У одного пациента ($8,3 \pm 8,0\%$) выявлена мутация гена NPM1, которая сочеталась с FLT3-ITD. В двух случаях ($16,7 \pm 10,8\%$) присутствовала мутация FLT3 D835, которая в обоих случаях сочеталась с мутацией FLT3-ITD.

В подгруппе пациентов с M4, состоящей из 10 пациентов, как и в предыдущей подгруппе выявлены все три типа анализируемых мутаций. У трех пациентов ($30,0 \pm 14,5\%$) была выявлена мутация FLT3-ITD, и по одному случаю ($10,0 \pm 9,5\%$) были представлены мутации FLT3 D835 и NPM1, которые не сочетались с FLT3-ITD.

Таким образом, в результате проведенного молекулярно-генетического анализа были описаны частоты 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 с участием NPM1. Важной с точки зрения диагностической чувствительности метода обнаружения исследуемых мутаций является их выявляемость в различных тканях. В нашем исследовании мы использо-

вали в качестве источника ДНК цельную венозную кровь и образцы костного мозга пациентов. В результате тестирования установлено, что не во всех случаях мутации выявляются одновременно в двух тканях: в четырех случаях мутации выявлялись только в образцах костного мозга, в одном случае мутация FLT3 D835 была выявлена только в образце крови. Исходя из этого для более точного анализа предпочтительней исследовать как кровь, так и костный мозг.

В процессе исследования молекулярно-генетический анализ мутаций генов FLT3 и NPM1 осуществлялся повторно после прохождения пациентом курса лекарственной терапии. В случае выявления у пациента при первичном анализе какой-либо из исследуемых мутаций повторное тестирование осуществлялось непосредственно перед последующим курсом терапии. При отсутствии мутаций – повторное тестирование проводилось после трех курсов лекарственной терапии непосредственно перед последующим курсом. Следует отметить, что на данном этапе исследования не было выявлено ни одного случая, когда мутации выявлялись только при повторном анализе при отрицательных результатах первичного тестирования.

Результаты проведенных тестирований анализируемых мутаций с учетом повторных исследований в группе пациентов с ОНЛЛ представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, в пяти случаях (AML004, AML029, AML038, AML085, AML088) повторное тестирование не проводилось по причине смерти пациента в период между первым и вторым курсом лекарственной терапии. Во всех этих случаях при первичном тестировании были выявлены мутации гена FLT3.

В связи с относительно малой выборкой проанализированных случаев ОНЛЛ, сопровождающихся мутациями генов FLT3 и NPM1, и коротким периодом наблюдения на данном этапе исследований нельзя сделать однозначный вывод об индивидуальном или сочетанном прогностическом значении выявленных мутаций. Тем не менее

Таблица 2 – Результаты первичного и повторного тестирования соматических мутаций генов FLT3 и NPM1 у пациентов с ОНЛЛ

ID пациента	FAB	ID материала	FLT3-ITD	FLT3 D835	NPM1	Статус на 20.03.2012 г.
AML004	M1	AML004/0	+	-	+	Умер
AML007	M4	AML007/0	+	-	-	Умер
		AML007/1	+	-	-	
AML029	M4	AML029/0	-	+	-	Умер
AML030	M1	AML030/0	-	-	+	Жив
		AML030/1	-	-	-	
		AML030/2	-	-	-	
		AML030/3	-	-	-	
		AML030/4	-	-	-	
AML031	M3	AML031/0	+	-	-	Жив
		AML031/1	-	-	-	
		AML031/2	-	-	-	
		AML031/3	-	-	-	
		AML031/4	-	-	-	
		AML031/5	-	-	-	
		AML031/6	-	-	-	
		AML031/7	-	-	-	
		AML031/8	-	-	-	
		AML031/9	-	-	-	
AML031/10	-	-	-			
AML038	M3	AML038/0	+	-	+	Умер
AML043	M1	AML043/0	-	-	+	Умер
		AML043/1	-	-	-	
		AML043/2	-	-	-	
		AML043/3	-	-	-	
		AML043/4	-	-	-	
		AML043/5	-	-	-	
		AML043/6	-	-	-	
		AML043/7	-	-	-	
AML046	M3	AML046/0	+	+	-	Умер
		AML046/1	+	-	-	
		AML046/2	+	-	-	
		AML046/3	+	-	-	
AML050	M1	AML050/0	+	-	+	Умер
		AML050/1	+	-	+	
		AML050/2	+	-	+	
		AML050/3	+	-	+	
AML052	M1	AML052/0	+	-	+	Умер
		AML052/1	+	-	+	
AML053	M1	AML053/0	+	-	+	Умер
		AML053/1	-	-	-	
		AML053/2	-	-	-	
		AML053/3	+	-	+	
		AML053/4	+	-	+	
		AML053/5	+	-	+	
AML058	M4	AML058/0	-	-	+	Умер
		AML058/1	-	-	-	
		AML058/2	-	-	-	
AML059	M3	AML059/0	+	-	-	Жив
		AML059/1	-	-	-	
		AML059/2	-	-	-	
		AML059/3	-	-	-	
		AML059/4	-	-	-	
		AML059/5	-	-	-	

Продолжение таблицы 2

ID пациента	FAB	ID материала	FLT3-ITD	FLT3 D835	NPM1	Статус на 20.03.2012 г.
AML060	M2	AML060/0	-	-	+	Жив
		AML060/1	-	-	-	
		AML060/2	-	-	-	
		AML060/3	-	-	-	
		AML060/4	-	-	-	
AML062	M1	AML062/0	-	-	+	Жив
		AML062/1	-	-	-	
		AML062/2	-	-	-	
AML068	M2	AML068/0	+	-	+	Умер
		AML068/1	+	-	+	
AML073	M3	AML073/0	+	+	-	Нет инф.
		AML073/1	-	-	-	
AML079	M2	AML079/0	+	-	+	Жив
		AML079/1	-	-	-	
		AML079/2	-	-	-	
AML083	M4	AML083/0	+	-	-	Жив
		AML083/1	+	-	-	
		AML083/2	-	-	-	
		AML083/3	-	-	-	
AML085	M4	AML085/0	+	-	-	Умер
AML088	M2	AML088/0	+	-	-	Умер
AML092	M0	AML092/0	+	-	-	Жив
		AML092/1	-	-	-	
AML093	M2	AML093/0	+	-	-	Жив
		AML093/1	-	-	-	

при анализе полученных данных обращает на себя внимание определенная тенденция.

Так, совместное проявление мутаций FLT3-ITD и NPM1 выявлено в 7 случаях. При этом в шести случаях из семи заболевание привело к смерти пациента в относительно короткий период от начала лечения – от одного до трех месяцев. Исключение составил пациент AML053, который скончался после проведения шестого курса химиотерапии. У данного пациента изначально выявленные мутации FLT3-ITD и NPM1 не были обнаружены после первого и второго курса лекарственной терапии, но в последующих трех этапах тестирования данные мутации вновь выявлялись. При этом в результате электрофоретического анализа было отмечено, что концентрация мутантной формы анализируемых фрагментов при последнем тестировании была значительно выше концентрации нормального фрагмента гена. Клинически было отмечено развитие резистентности к проводимой лекарственной терапии, что привело к летальному исходу в последующем. Данный случай

позволяет рассматривать изучаемые мутации генов FLT3 и NPM1 не только как маркеры эффективности проводимой терапии, но и как маркеры молекулярного рецидива.

Наличие у пациента только мутации NPM1 зафиксировано в пяти случаях (AML030, AML043, AML058, AML060 и AML062). При этом к настоящему времени из их числа от основного заболевания скончался один пациент. Пациент AML058, несмотря на отсутствие рецидива, скончался от спонтанного разрыва аневризмы грудной аорты. Для остальных пациентов отмечается устойчивая ремиссия, что может свидетельствовать об относительно благоприятном прогнозе при наличии мутации NPM1. Однако для однозначной оценки требуется увеличение числа случаев и периода наблюдения.

В некоторых случаях (AML007, AML046, AML050, AML052 и AML068) изначально выявленные мутации определялись при каждом повторном тестировании. Данный факт может свидетельствовать о недостаточной эффективности

использованной лекарственной терапии, что, в свою очередь, определяет наиболее неблагоприятный исход. Все эти случаи имели летальный исход в период от двух до четырех месяцев.

В ходе проведенных исследований показано, что в ряде случаев после проведенного курса лекарственной терапии изначально выявленные мутации не определялись в последующих повторных тестах. Подобное было отмечено у 11 пациентов (таблица 2). Это указывало на существенное снижение количества мутантных клеток либо об их исчезновении, что, соответственно, отражало успешность проводимой лекарственной терапии. Из одиннадцати случаев смерть от основного заболевания в настоящее время наступила у одного пациента.

Отмечен также случай неблагоприятного прогноза развития заболевания при наличии мутации FLT3-ITD. Это касается пациента AML083, которому при поступлении был выставлен диагноз МДС РАИБ. В результате проведенного молекулярно-генетического анализа в крови и костном мозге данного пациента была выявлена мутация FLT3-ITD. Учитывая данный факт, пациент был повторно обследован через 3 месяца. Было установлено, что МДС РАИБ трансформировался в острый миеломонобластный лейкоз (M4). Повторное тестирование подтвердило факт присутствия в крови и костном мозге мутации FLT3-ITD. После проведения первого курса лекарственной терапии данная мутация не выявлена.

Заключение

Проведенное исследование позволило дать оценку распространенности клинически значимых мутаций генов FLT3 и NPM1 в группах пациентов с МДС РАИБ и ОНЛЛ. Дана молекулярно-генетическая характеристика пяти основных форм ОНЛЛ при первичном тестировании и в ходе проведения лекарственной терапии. Показана потенциальная возможность использования выявленных мутаций в качестве генетических маркеров прогноза и эффективности проводимой терапии. Установлено, что для

более точной оценки необходимо проводить тестирования образцов ДНК, выделенных как из крови, так и костного мозга.

В настоящее время исследование продолжается с целью получения более точной оценки прогностических и диагностических качеств анализируемых мутаций на основании анализа большего количества пациентов и увеличения периода наблюдения.

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. Evaluation of Minimal Residual Disease Using Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction in t(8;21) Acute Myeloid Leukemia: A Multicenter Study of 51 Patients / Morschhauser [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2000. – V. 18, № 4. – P. 788-794.
2. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase polymerase chain reaction of the PML/RARA fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter «AIDA» trial / Diverio [et al.] // *Blood.* – 1998. – V. 92. – P.784-789.
3. Presenting white blood count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: results of the randomized MRC trial / Burnett [et al.] // *Blood.* – 1999. – V. 93. – P.4131-4143.
4. Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia / Grimwade [et al.] // *Blood.* – 1997. – V.90. – P.4876-4885.
5. Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. MRC Adult Leukaemia Working Party / Langabeer [et al.] // *Br J Haematol.* – 1997. – V. 99, №4. – P.925-928.

6. Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBFbeta/MYH11 rearrangement / Martin [et al.] // *Haematologica*. – 2000. – V. 85. – P. 699-703.

7. Competitive CBFbeta/MYH11 reverse-transcription polymerase chain reaction for quantitative assessment of minimal residual disease during postremission therapy in acute myeloid Leukemia with inversion (16): a pilot study / Laczika [et al.] // *Clin Oncol*. – 1998. – V. 16. – P.1519-1525.

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

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. Бавыкин, А.С. FLT3-тирозинкиназа при острых нелимфобластных лейкозах / А.С. Бавыкин, М.А. Волкова // *Онкогематология*. – 2006. – №1-2. – С. 15-24.

A.E. Silin, Zh.M. Kozich, V.K. Shpudayko, I.B. Tropashko, V.N. Martinkov, A.A. Silina, S.M. Martynenko, A.V. Voropayeva

MOLECULAR AND GENETIC DESCRIPTION OF MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME AND ACUTE NONLYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN ADULT PATIENTS DURING PRIMARY TESTING AND TREATMENT

Following the molecular genetic analysis of DNA samples in 18 patients with MDS RAEB and 65 patients with various ANLL the frequencies of FLT3 and NPM1 gene mutations were identified in each of the subgroups of the study. One case of NPM1 gene mutation was diagnosed in the group of patients with MDS RAEB (5,6±5,4%). FLT3-ITD mutations were detected in patients with ANLL (26,2±5,5% of patients), the mutation of the NPM1 gene – in 18,5±4,8% of patients, and FLT3 D835 – in 4,6±2,6% of patients. In most cases, NPM1 gene mutation was detected with the FLT3-ITD. The FLT3-ITD mutations were often detected in the M3 subgroup, and NPM1 mutations in the M1 subgroup. The potential use of the identified mutations as genetic markers of prognosis and the effectiveness of the therapy is shown. The further research with increase number of observed cases and the observation period is required to obtain a more accurate assessment of the significance of these markers.

Key words: *myelodysplastic syndrome, acute nonlymphoblastic leukemia, FLT3-ITD, FLT3 D835, NPM1, polymerase chain reaction*

Поступила 23.03.12