

- chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic leukemia with 17p deletion: results from the phase II RESONATE™-17 trial. (ASH Annual Meeting Abstracts). *Blood*. 2014; 124(21): 327. <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/327?ssoc-checked=true>.
36. FDA Expands Approved Use of Imbruvica for Chronic Lymphocytic Leukemia. <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-expands-approved-imbruvica-chronic-lymphocytic-leukemia-4061.html>.
37. Burger J.A., Tedeschi A., Barr P.M., Robak T., Owen C., Ghia P., et al. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373(25): 2425–37. doi: 10.1056/NEJMoa1509388.
38. FDA Approves Imbruvica (ibrutinib) for the First-Line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. <http://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-imbruvica-ibrutinib-first-line-chronic-lymphocytic-leukemia-4353.html>.
39. Fraser G., Cramer P., Demirkan F., Silva R.S., Pylypenko H., Grosicki S., et al. Ibrutinib (I) plus bendamustine and rituximab (BR) in previously treated chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL): a 2-year follow-up of the HELIOS study. *J. Clin. Oncol.* 2016; 34: Abstract 7525.
40. Maddocks K.J., Ruppert A.S., Lozanski G., Heerema N.A., Zhao W., Abruzzo L., et al. Etiology of ibrutinib therapy discontinuation and outcomes in patients with chronic lymphocytic leukemia. *JAMA Oncol.* 2015; 1(1): 80–7. doi:10.1001/jamaoncol.2014.218.
41. Jain P., Keating M., Wierda W., Estrov Z., Ferrajoli A., Jain N., et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood*. 2015; 125(13): 2062–7. doi:10.1182/blood-2014-09-603670.
42. Public Workshop on Minimal Residual Disease (MRD) as a Surrogate Endpoint in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). <http://www.fda.gov/Drugs/NewsEvents/ucm340707.htm>

Поступила 20.10.16

Принята к печати 22.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.192-07:575.08

Субботина Т.Н.^{1,3}, Дунаева Е.А.², Миронов К.О.², Дрибноходова О.П.², Харсекина А.Е.¹,
Васильев Е.В.⁵, Хоржевский В.А.⁶, Ольховский И.А.^{1,4}, Шипулин Г.А.²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АЛЛЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ МУТАЦИЙ В 12-М ЭКЗОНЕ ГЕНА JAK2

¹Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 660036, г. Красноярск, Россия;

²ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», 660041, г. Красноярск, Россия;

⁴ФГБУН «Красноярский научный центр» Сибирского отделения РАН, 660036, г. Красноярск, Россия;

⁵КГБУЗ Краевая клиническая больница, 660022, г. Красноярск, Россия;

⁶КГБУЗ Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро, 660022, г. Красноярск, Россия

Соматические мутации в кодонах 532–547 12-го экзона гена *JAK2* высокоспецифичны для подтверждения диагноза истинной полицитемии. Цель настоящей работы – разработка методики для обнаружения и количественной оценки уровня аллельной нагрузки данных мутаций с использованием технологии пиросеквенирования. Определение нуклеотидной последовательности проводили на приборе PyroMark Q24. Для верификации наличия мутаций выполняли клонирование ДНК, выделенной из клинических образцов. Секвенирование клонов проводили с использованием реагентов и оборудования фирмы “Applied Biosystems” (США). После подтверждения наличия мутации в клонх методом Сэнгера, образец, содержащий мутацию, повторно анализировали на приборе PyroMarkQ24 в количественном формате для определения уровня аллельной нагрузки. Среди 48 образцов ДНК от пациентов с высокой клинико-гематологической вероятностью диагноза истинной полицитемии и отсутствием мутации V617F в 14-м экзоне гена *JAK2* был идентифицирован один образец, содержащий наиболее распространенную в области 12-го экзона данного гена соматическую мутацию N542-E543 del. Определение уровня аллельной нагрузки проводили трижды в динамике развития заболевания с августа 2013 г. по июнь 2015 г. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе развития заболевания аллельная нагрузка у пациента возрастает и за 23 мес наблюдения этот показатель вырос более чем в 2 раза, что свидетельствует о соответствующем увеличении количества клеток трансформированного клона. В то же время до настоящего момента у пациента наблюдается клинико-гематологическая компенсация заболевания на фоне проведения умеренных терапевтических воздействий – эксфузионной и дезагрегационной терапии. Предложенная методика позволяет детектировать мутации в анализируемом фрагменте, а также проводить количественный мониторинг аллельной нагрузки в динамике заболевания с целью контроля эффективности используемой терапии.

Ключевые слова: мутации в 12-м экзоне гена *JAK2*; миелопролиферативные заболевания; истинная полицитемия; пиросеквенирование.

Для цитирования: Субботина Т.Н., Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Харсекина А.Е., Васильев Е.В., Хоржевский В.А., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. Использование метода пиросеквенирования для выявления и количественной оценки аллельной нагрузки мутаций в 12-м экзоне гена *JAK2*. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 19(4): 196–200. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-196-200>

Для корреспонденции:

Субботина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской биологии ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, старший научный сотрудник Красноярского филиала ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 660036, г. Красноярск, Россия. E-mail: stn.25@mail.ru.

For correspondence:

Subbotina Tatiana N., BD, PhD, assistant professor of the Department of Medical Biology of the Siberian Federal University; senior researcher Krasnoyarsk branch of the Federal State budgetary Institution Hematology Research Center. Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation. E-mail: stn.25@mail.ru

Information about authors:

Subbotina T.N., <http://orcid.org/0000-0001-7790-5033>; Dunaeva E.A., <http://orcid.org/0000-0002-4477-8506>; Mironov K.O., <http://orcid.org/0000-0001-8207-9215>; Dribnokhodova O.P., <http://orcid.org/0000-0003-4918-4907>; Kharsekina A.E., <http://orcid.org/0000-0003-3395-775X>; Vasiliev E.V., <http://orcid.org/0000-0003-3780-3758>; Khorzhevskiy V.A., <http://orcid.org/0000-0002-9196-7246>; Olkhovskiy I.A., <http://orcid.org/0000-0003-2311-2219>; Shipulin G.A., <http://orcid.org/0000-0002-3668-6601>.

Subbotina T.N.^{1,3}, Dunaeva E.A.², Mironov K.O.², Dribnokhodova O.P.², Harsekina A.E.¹,
Vasilyev E.V.⁵, Khorzhevskiy V.A.⁶, Olkhovskiy I.A.^{1,4}, Shipulin G.A.²

USING OF PYROSEQUENCING METHOD FOR THE DETECTION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF MUTANT JAK2 EXON 12 ALLELE BURDEN

¹Krasnoyarsk branch of the Federal State budgetary Institution «Hematology Research Center»

Department of Health, 660036, Krasnoyarsk, Russian Federation;

²Federal Budget Institute of Science «Central research institute for Epidemiology», 111123, Moscow, Russian Federation;

³Siberian Federal University, 660041, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁴Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
660036, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁵Krasnoyarsk regional hospital, 660022, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁶Krasnoyarsk State Regional Bureau of Pathology, 660022, Krasnoyarsk, Russian Federation

Somatic mutations in codons 532–547 of JAK2 exon 12 are highly specific to confirm the diagnosis of polycythemia vera (PV). The aim of this study was to develop the pyrosequencing method for the detection and quantification of JAK2 exon 12 allele burden. The nucleotide sequencing of the JAK2 exon 12 fragment was carried out with the use of "PyroMark Q24". To verify the presence of mutations, the DNA sequences extracted from the clinical samples were cloned and obtained clones were sequenced with the use of reagents and equipment of the "Applied Biosystems" (USA). A sample containing the mutation was analyzed again after confirming the presence of mutations in clones by Sanger sequencing with "PyroMark Q24" for the quantification of the JAK2 exon 12 allele burden. Among 48 of JAK2 V617F-negative PV patients, who had a high clinical and hematological probability of PV diagnosis, a N542-E543 del mutation of JAK2 in exon 12 has been detected in the 62-years old male patient. The detection and quantification of the JAK2 exon 12 allele burden by virtue of using a pyrosequencing method for this patient was carried out three times from August 2013 to June 2015. Our results show the JAK2 N542-E543 del allele burden to increase more than twice during 23 months of following up of the patient. These data suggest about increase of the number of the transformed clonal cells. The proposed method allows detecting and carrying out quantitative determination of the mutant JAK2 exon 12 allele burden for monitoring the efficacy of the therapy.

Key words: exon 12 JAK2 mutations; myeloproliferative disease; polycythemia vera; pyrosequencing.

For citation: Subbotina T.N., Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P., Harsekina A.E., Vasilyev E.V., Khorzhevskiy V.A., Olkhovskiy I.A., Shipulin G.A. Using of pyrosequencing method for the detection and quantitative determination of mutant JAK2 exon 12 allele burden. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 19(4): 196-200. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-196-200>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 23 September 2015

Accepted 12 July 2016

Для подтверждения диагноза одного из наиболее распространенных Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваний (ХМПЗ) – истинной полицитемии (ИП), в соответствии с клиническими рекомендациями ВОЗ [1], достаточно наличия высокого содержания гемоглобина и гематокрита, а также выявления какой-либо из клинически значимых соматических мутаций в гене JAK2. Ключевым звеном патогенеза ИП является независимая активация JAK-STAT сигнального пути, чаще всего обусловленная мутацией V617F в 14-м экзоне гена JAK2 [2].

Для определенного числа V617F-отрицательных больных с клиническим диагнозом ИП характерны иные мутации в гене JAK2, происходящие в онкоассоциированной последовательности 12-го экзона (микроделеции, микроинсерции и точечные мутации, затрагивающие аминокислотные остатки в положении 532–547 белка Jak2). Согласно информации, представленной в базе данных COSMIC [3], в этом фрагменте описано более 40 соматических мутаций, встречающихся с разной частотой и имеющих клиническое значение для подтверждения ИП [4, 5]. Частота встречаемости таких мутаций среди больных ИП составляет около 5% для европейской популяции [6] и около 13% для китайской [5]. Клиническая картина течения заболевания и факторы риска развития тромбоза и вторичного миелофиброза у больных ИП, обусловленные возникновением мутации в 12-м экзоне гена JAK2, не имеют значимых отличий от соответствующих проявлений у V617F-положительных больных [7].

Для анализа как отдельных, так и всего спектра мутаций в области 12-го экзона гена JAK2 используют различные молекулярно-генетические методики, основанные на секвениро-

вании ДНК [8], модификации полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ): аллель-специфичная ПЦР [9, 10], методы детекции мутаций на основании анализа кривых плавления [11–13], а также некоторые другие методики [14, 15]. Тем не менее ни один из предложенных методов не может одновременно и однозначно определить все возможные варианты указанных соматических мутаций ввиду их разнообразия, а также то, что уровень аллельной нагрузки соматическими мутациями в крови пациента зачастую оказывается ниже уровня чувствительности предложенного метода. В связи с этим выявление мутаций в 12-м экзоне гена JAK2 пока не является рутинной процедурой в практике клинико-диагностических лабораторий.

Ранее мы предложили метод количественного определения аллельной нагрузки мутации JAK2V617F в 14-м экзоне гена JAK2 методом пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 [16].

Цель настоящей работы – разработка методики для обнаружения и количественной оценки уровня аллельной нагрузки соматических мутаций в кодонах 532–547 12-го экзона гена JAK2 методом пиросеквенирования.

Материал и методы

Анализ 12-го экзона гена JAK2 проводили на 48 образцах ДНК, собранных в лаборатории Красноярского филиала Гематологического научного центра в период 2012–2015 гг. от пациентов с высокой клинико-гематологической вероятностью диагноза ИП и отсутствием мутации V617F в 14-м экзоне гена JAK2. Отсутствие мутации V617F для всех образцов определено с помощью коммерческой тест-системы фирмы «Литех»

Результаты клинико-гематологического исследования и анализа уровня аллельной нагрузки мутацией N542-E543 del в динамике течения заболевания у обследуемого пациента

Показатель	Август 2013 г.	Январь 2015 г.	Июнь 2015 г.
Гемоглобин, г/л	156	181	134
Гематокрит, %	49,9	61,6	48,4
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	6,5	9,76	7,82
Ретикулоциты, %	1,43	-	2,05
Фракция незрелых ретикулоцитов, %	12,1	-	36,7
Ретикулоциты с низкой флюоресценцией, %	87,9	-	63,3
Ретикулоциты со средней флюоресценцией, %	10,2	-	19,7
Ретикулоциты с высокой флюоресценцией, %	1,9	-	17
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	5,14	9,13	8,35
Лимфоциты, $\times 10^9/л$	2	2,27	2,20
Лимфоциты, %	25	24,9	26,3
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	182	102	237
Размер селезенки, см	11,2 $\times$ 6,2	13,6 $\times$ 6,2	12,7 $\times$ 5,7
Уровень аллельной нагрузки, %	15	28	36

(ПЦР-РВ), а также подтверждено при использовании набора реагентов АмплиСенс Пироскрин. Выделение ДНК проводили из лейкоцитов 250 мкл цельной периферической крови с помощью набора ДНК-сорб-В (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии, Москва).

Определение нуклеотидной последовательности фрагмента 12-го экзона гена *JAK2* проводили с помощью технологии пиросеквенирования по методике, описанной К.О. Мироновой и соавт. [17].

Все реагенты для постановки ПЦР и процедуры пробоподготовки продуктов амплификации произведены ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии («АмплиСенс», Россия). Для амплификации фрагмента длиной 155 п.о., содержащего анализируемую область 12-го экзона гена *JAK2*, были использованы следующие праймеры: CTCACCAACATTACAGAGGCCTACT (прямой праймер) и biotin-GTCACATGAATGTAAATCAAGAAAACAGATG (обратный праймер). Амплификацию проводили в объеме 25 мкл. Смесь для проведения реакции готовили следующим образом: 5 мкл смеси, содержащей праймеры и дезоксинуклеозидтрифосфаты, смешивали с 0,5 мкл реактива полимеразы TaqF, 9,5 мкл 2,5хПЦР-буфера blue и 10 мкл выделенной ДНК. Постановку ПЦР проводили на приборе МахуGene («Axygen», США) по следующей программе: 95 °C – 15 мин; 95 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 20 с (45 циклов).

Анализ продуктов амплификации проводили на приборе PyroMark Q24 (версия программного обеспечения 2.0.6) с использованием набора реагентов PyroMark Gold («Qiagen», Германия). Для получения более точных результатов секвенирование каждого клинического образца проводили с использованием двух праймеров: CTCACCAACATTACAGAGGCCTACT (S1) и GCCTACTCATATGAACCAAATGG (S2). Пиросеквенирование проводили в формате *de novo* (SQA), последовательность добавления нуклеотидов: G, A, C и T 20 циклов.

Параллельно с клиническими образцами анализировали контрольный образец, не содержащий мутацию, ПКД ДНК человека («АмплиСенс», Россия). Полученные данные сохранялись в виде файлов *.xlsx и далее относительные высоты сигналов, соответствующие нуклеотидам в последовательности анализируемого локуса анализировали на наличие каких-либо отклонений от результатов контрольного образца дикого типа.

Для верификации наличия мутаций в образцах с отклонениями от последовательности «дикого типа» проводили секвенирование методом Сэнгера (Sanger) [18]. Для этого ДНК, выделенную из этих клинических образцов, клонировали в вектор pGem-T по стандартной методике («Promega», США) [19].

Секвенирование клонов проводили с помощью реагентов и оборудования фирмы «Applied Biosystems» (США). После подтверждения мутации в клонах методом Сэнгера образец, содержащий мутацию, повторно анализировали на приборе PyroMark Q24. Анализ проводили в количественном формате (AQ) с использованием последовательности добавления нуклеотидов, соответствующей обнаруженной мутации, для определения уровня аллельной нагрузки выявленной мутации в образце.

Обработку полученных данных проводили с помощью стандартных средств программных возможностей MS Excel.

Результаты

В результате проведенного тестирования с использованием технологии пиросеквенирования из 48 клинических образцов был обнаружен один образец, содержащий наиболее распространенную в области 12-го экзона гена *JAK2* соматическую мутацию N542-E543 del.

Больной, в гене *JAK2* которого обнаружена мутация, мужчина в возрасте 62 лет. На момент диагностики заболевания в июле 2013 г. у больного присутствовал выраженный плеторический синдром, спленомегалия не выявлялась, в периферической крови отмечались повышенная концентрация гемоглобина (204 г/л), гематокрита (71,5%) и количества эритроцитов ($6,43 \times 10^{12}/л$). При этом количество лейкоцитов ($8 \times 10^9/л$) и тромбоцитов ($250 \times 10^9/л$) не превышало норму. На фоне проведения 7 эксфузий крови по 450–500 мл (июль–август 2013 г.) достигнута клинико-гематологическая компенсация заболевания. В течение последующих 18 мес наблюдения у больного медленно рецидивировало полнокровие, сохранялась артериальная гипертензия, амбулаторно проводили терапию дезагрегантами и гипотензивными средствами. В январе–феврале 2015 г. больному выполнен повторный курс кровопусканий (4 кровопускания по 450–500 мл крови). Увеличение селезенки в это время пальпаторно не зарегистрировано, но однократно по данным ультразвукового исследования в феврале 2015 г. отмечалось увеличение ее размера до 13,6 $\times$ 6,2 см (умеренная спленомегалия). Через 5 мес, при очередном контрольном обследовании (июнь 2015 г.) отмечена симптоматика умеренного полнокровия, при этом спленомегалия и панцитоз в гемограмме отсутствовали.

В целом за все время наблюдения за пациентом (июль 2013 г. – июнь 2015 г.) можно отметить, что содержание гемоглобина, гематокрита и эритроцитов на фоне проведения эксфузий либо умеренно превышало норму, либо находилось на ее верхней границе (см. таблицу). Выявлено значительное увеличение фракции незрелых ретикулоцитов (как со средним, так и с высоким содержанием РНК) на фоне относительного снижения наиболее зрелых ретикулоцитов, что свидетельствует о значительном росте пролиферативной активности эритроидного ростка кроветворения. Количество тромбоцитов и лейкоцитов не имело значительных различий от нормы. Тромботических эпизодов не зарегистрировано, циторедуктивная терапия не проводится.

Диагноз ИП был подтвержден морфологическим исследованием трепанобиоптата костного мозга в августе 2015 г. При микроскопическом исследовании отмечено, что клеточность костного мозга равномерно повышена относительно возрастной нормы до 100% (норма 40–50%). Мегакариотарный росток был гиперплазирован, представлен большей частью (более 80%) атипичными формами, среди которых преобладают мегакариоты больших, в меньшей степени средних размеров с нарушением ядерно-цитоплазматического соотношения. Встречались клетки с гиперглобулированными ядрами и единичные «staghorn-like»-формы. Отдельные мегакариоты были расположены паракостально, непосредственно контактируя с костными балками. Разрозненно определяются рыхлые кластеры атипичных мегакариот. Эритроидный росток омоложен с наличием большого количества ранних форм, нормобластического типа с формированием большого количества эритроидных островков, в составе которых преобладают промежуточные формы. Гранулоцитарный росток гиперплазирован, определялся на всех

стадиях созревания. При импрегнации солями серебра по Гомори [20] – MF-0. Костные балки с явлениями системного остеопороза.

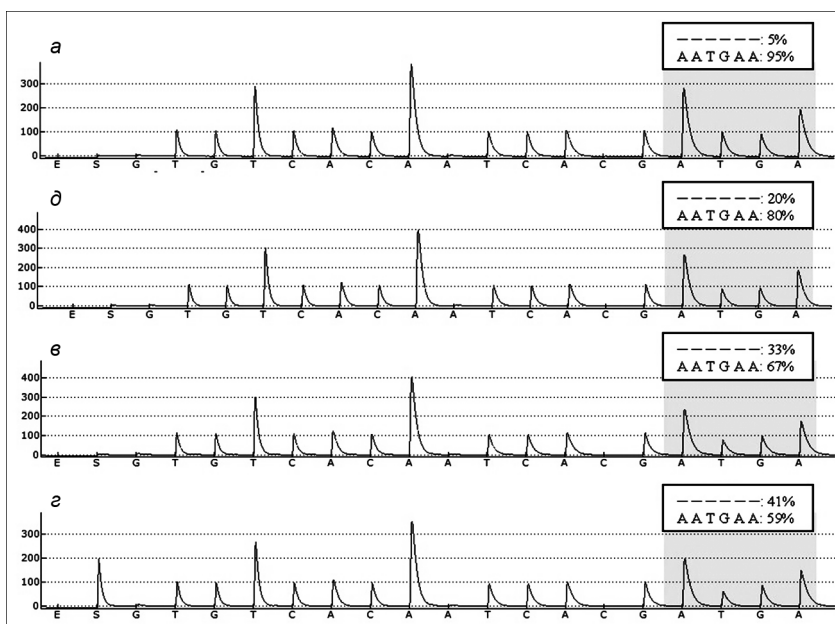
Определение уровня аллельной нагрузки мутацией N542-E543 del проводили трижды в динамике развития заболевания на образцах ДНК, полученных из лейкоцитов цельной крови больного в августе 2013 г., январе 2015 г. и июне 2015 г. Результаты количественного анализа всех трех проб ДНК методом пиросеквенирования приведены на рисунке. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе развития заболевания аллельная нагрузка у больного возрастает и за 23 мес наблюдения этот показатель вырос более чем в 2 раза.

Обсуждение

В литературе описаны [21, 22] примеры определения уровня аллельной нагрузки мутациями в 12-м экзоне гена *JAK2* в динамике заболевания, но до сих пор не было описано случаев, когда за наблюдаемый период времени происходило бы ее значимое и однонаправленное изменение. L. Kjær и соавт. [21] описали 3 случая наблюдения за изменением уровня аллельной нагрузки при различных вариантах мутаций в 12-м экзоне гена *JAK2* (в том числе и при наличии мутации N542-E543 del), а также при изначально различном уровне аллельной нагрузки в течение 429, 735 и 203 дней соответственно. Показано, что аллельная нагрузка во всех случаях оставалась стабильной в течение длительного времени наблюдения. A. Theodorides и соавт. [22] также описали случаи стабильного состояния аллельной нагрузки мутациями в 12-м экзоне гена *JAK2* в динамике заболевания для 3 больных ИП в течение 2, 3 и 4,5 лет. Причем у 2 из 3 больных циторедуктивной терапии не было в течение всего времени наблюдения, а 1 больной принимал гидроксимочевину уже на момент начала исследования. В нашем исследовании наблюдается явное увеличение аллельной нагрузки в динамике заболевания. В то же время нужно отметить, что на фоне обнаруженного повышения аллельной нагрузки за данный период времени у обследуемого нами больного не выявлено отрицательной клинической динамики (симптоматика полнокровия умеренная, панцитоз в гемограмме отсутствует, спленомегалия и тромботических осложнений нет).

Представленные данные получены при исследовании ДНК, выделенной из лейкоцитов цельной крови со стабильным соотношением лимфоцитов и гранулоцитов (см. таблицу), что исключает вероятность ошибок [21, 23] количественного анализа аллельной нагрузки, обусловленных возможным различием соотношения ДНК-содержащих клеток гранулоцитарного и лимфоцитарного ряда в разные дни взятия крови.

Обнаруженный в нашей работе процесс роста аллельной нагрузки свидетельствует о двукратном увеличении количества клеток трансформированного клона в динамике заболевания у обследованного больного. В то же время до настоящего момента у больного имеется клинко-гематологическая компенсация заболевания на фоне проведения умеренных терапевтических воздействий – эксфузионной и дезагрегационной терапии. В литературе мы не обнаружили данных о риске развития серьезных осложнений ИП при увеличении аллельной нагрузки мутациями в 12-м экзоне гена *JAK2*, и вопрос обоснованности превентивного терапевтического воздействия с целью редукции трансформированных клеток остается открытым. Предлагаемый нами метод количественного определения аллельной нагрузки мутациями в 12-м экзоне гена *JAK2* будет полезен в клинических исследованиях для



Результаты анализа соматической мутации N542-E543 del методом пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24. В области выделенных 6 нуклеотидов детектируется делеция в одном из аллелей гена. Об этом свидетельствует снижение уровня сигнала для встраиваемых нуклеотидов в данной области. Количественный расчет соотношения интактных и мутантных молекул ДНК в образцах из венозной крови (аллельная нагрузка) выполняется программным обеспечением прибора.

a – результат анализа образца ДНК «дикого типа» (без мутации); б – результат анализа образца ДНК от пациента с мутацией (август 2013 г.); в – результат анализа образца ДНК от пациента с мутацией (январь 2015 г.); г – результат анализа образца ДНК от пациента с мутацией (июнь 2015 г.).

объективного мониторинга молекулярной прогрессии заболевания и эффективности терапии при ИП.

Таким образом, предложенная методика позволяет детектировать мутации в анализируемом (примыкающем к началу псевдокизного домена гена *JAK2*) фрагменте и проводить количественный мониторинг аллельной нагрузки в динамике развития заболевания, а также может использоваться для контроля эффективности элиминации трансформированного клеточного клона. Предел чувствительности обнаружения соматических мутаций методом пиросеквенирования находится в диапазоне 2–5% мутантной фракции [16, 24–26] и при необходимости может быть увеличен за счет обогащения доли мутантной фракции [27]. Технология пиросеквенирования представляет собой быстрый точный и надежный подход с высокой пропускной способностью для исследования и других мишеней, подобных 12-му экзону гена *JAK2*.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

16. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Субботина Т.Н., Башмакова Е.Е., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. Количественное определение мутации V617F в гене *JAK2* методом пиросеквенирования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 11: 60–3.
17. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шипулин Г.А. Детекция генетических полиморфизмов с использованием системы генетического анализа на основе пиросеквенирования PyroMark Q24. *Справочник заведующего КДЛ*. 2011; 4: 39–48.
20. Лилли Р. *Патогистологическая техника и практическая гистология*. Пер с англ. М.: Мир; 1969.
25. Дрибноходова О.П., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Демидова И.А., Баринин А.А., Войцеховская Я.А. и др. Выявление активирующих соматических мутаций в гене *KRAS* методом пиросеквенирования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 6: 49–51.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

1. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 WHO criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008; 22(1): 14–22.

2. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swanton S., et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365(9464): 1054–61.
3. Catalog of somatic mutations in cancer. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
4. Scott L.M. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am. J. Hematol.* 2011; 86(8): 668–76.
5. Wu Z., Zhang X., Xu X., Chen Y., Hu T., Kang Z., et al. The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Hematol. Oncol.* 2014; 7: 48. doi: 10.1186/s13045-014-0048-6.
6. Pardanani A., Lasho T.L., Finke C., Hanson C.A., Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007; 21(9): 1960–3.
7. Passamonti F., Elena C., Schnittger S., Skoda R.C., Green A.R., Girodon F., et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011; 117(10): 2813–6.
8. Pietra D., Li S., Brisci A., Passamonti F., Rumi E., Theodorides A., et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008; 111(3): 1686–9.
9. Scott L.M., Tong W., Levine R.L., Scott M.A., Beer P.A., Stratton M.R., et al. Green AR. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(5): 459–68.
10. Percy M.J., Scott L.M., Erber W.N., Harrison C.N., Reilly J.T., Jones F.G., et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica*. 2007; 92(12): 1607–14.
11. Jones A.V., Cross N.C., White H.E., Green A.R., Scott L.M. Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis. *Haematologica*. 2008; 93(10): 1560–4.
12. Ugo V., Tondeur S., Menot M.L., Bonnin N., Le Gac G., Tonetti C., et al.; French Intergroup of Myeloproliferative disorders. Interlaboratory development and validation of a HRM method applied to the detection of JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera patients. *PLoS One*. 2010; 5(1): e8893.
13. Schnittger S., Bacher U., Haferlach C., Geer T., Müller P., Mittermüller J., et al. Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica*. 2009; 94(3): 414–8.
14. Laughlin T.S., Moliterno A.R., Stein B.L., Rothberg P.G. Detection of exon 12 Mutations in the JAK2 gene: enhanced analytical sensitivity using clamped PCR and nucleotide sequencing. *J. Mol. Diagn.* 2010; 12(3): 278–82.
15. Furtado L.V., Weigelin H.C., Elenitoba-Johnson K.S., Betz B.L. A multiplexed fragment analysis-based assay for detection of JAK2 exon 12 mutations. *J. Mol. Diagn.* 2013; 15(5): 592–9.
16. Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P., Subbotina T.N., Bashmakova E.E., Olkhovskiy I.A., Shipulin G.A. The quantitative testing of V617F mutation in gen JAK2 using pyrosequencing technique. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics Journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2014; 59(11): 60–3. (in Russian)
17. Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P., Shipulin G.A. Detection of genetic polymorphism with the use of Genetic analysis based on pyrosequencing PYROMARK Q24. *Directory manager of clinical laboratory diagnostics. Russian Journal (Spravochnik zaveduyushchego KDL)*. 2011; 4: 39–48. (in Russian)
18. Lillie R.D. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. New York: McGraw Hill Book Co; 1965.
19. Kjaer L., Westman M., Hasselbalch Riley C., Høgdall E., Weis Bjerrum O., Hasselbalch H. A highly sensitive quantitative real-time PCR assay for determination of mutant JAK2 exon 12 allele Burden. *PLoS One*. 2012; 7(3): 1–8.
20. Theodorides A., Passweg J.R., Medinger M., Looser R., Li S., Hao-Shen H., et al. The allele burden of JAK2 mutations remains stable over several years in patients with myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2008; 93(12): 1890–3.
21. Li S., Kralovics R., De Libero G., Theodorides A., Gisslinger H., Skoda R.C. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood*. 2008; 111(7): 3863–6.
22. Tsiatis A.C., Norris-Kirby A., Rich R.G., Hafez M.J., Gocke C.D., Eshleman J.R., et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn.* 2010; 12(4): 425–32.
23. Dribnokhodova O.P., Mironov K.O., Dunaeva E.A., Demidova I.A., Barinov A.A., Voytsekhovskaya Ya.A., et al. The detection of activating somatic mutations in gene kras using pyrosequencing technique. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics Journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2013; 58(6): 49–51. (in Russian)
24. Xie G., Xie F., Wu P., Yuan X., Ma Y., Xu Y., et al. The mutation rates of EGFR in non-small cell lung cancer and KRAS in colorectal cancer of Chinese patients as detected by pyrosequencing using a novel dispensation order. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2015; 34(1): 63. doi: 10.1186/s13046-015-0179-9.
25. Milbury C.A., Li J., Makrigiorgos G.M. Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(1): e2. doi: 10.1093/nar/gkq899/

Поступила 23.09.15

Принята к печати 12.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.392.2-036.11-036.86-07

Комков А.Ю.^{1,2}, Мирошниченкова А.М.², Ольшанская Ю.В.², Мякова Н.В.², Дьяконова Ю.Ю.²,
Минервина А.А.¹, Мамедов И.З.¹, Лебедев Ю.Б.¹, Масчан А.А.², Масчан М.А.²

ДЕТЕКЦИЯ ПЕРЕСТРОЕК ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ ГЕНОВ ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

¹ФАНО России ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997, г. Москва, Россия;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии, иммунологии
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия

Мониторинг минимальной остаточной болезни является одним из важнейших инструментов при терапии острых лимфобластных лейкозов. Однако применение его в клинической практике имеет ряд существенных ограничений, связанных с методологическими сложностями, высокой стоимостью и зачастую неоднозначностью интерпретации результатов. В данной работе описывается система для идентификации клональных перестроек в локусах иммуноглобулиновых генов с использованием метода высокопроизводительного секвенирования нового поколения. Проведена апробация системы на 17 клинических образцах, взятых у детей, больных В-клеточным острым лимфобластным лейкозом. Для 16 исследованных образцов обнаружено от 1 до 6 различных перестроек иммуноглобулиновых генов. Сравнение новой системы с традиционно используемой системой BIOMED-2 показало высокую корреляцию результатов. Дальнейшее развитие системы позволит создать высоконадежный и чувствительный метод для мониторинга минимальной остаточной болезни.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз; минимальная остаточная болезнь; перестройки иммуноглобулиновых генов; высокопроизводительное секвенирование.

Для цитирования: Комков А.Ю., Мирошниченкова А.М., Ольшанская Ю.В., Мякова Н.В., Дьяконова Ю.Ю., Минервина А.А., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б., Масчан А.А., Масчан М.А. Детекция перестроек иммуноглобулиновых генов при острых лимфобластных лейкозах с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 200-204. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-200-204>