

другой работник, отвечающий за профилактику внутрибольничных инфекций). Копию акта об аварии представляют в центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора зоны ответственности.

Медицинские работники, получившие травму при оказании медицинской помощи больному вирусным гепатитом или носителю Hb₃Ag, антител к вирусу гепатита С, подлежат диспансерному наблюдению не менее 6–12 мес с контролем крови на маркёры вирусных гепатитов В и С.

По ВИЧ-инфекции медицинский работник находится под наблюдением 12 мес с исследованием крови, проведённым в день аварийной ситуации, затем через 1,5; 3; 6; 12 мес.

В целях повышения безопасности проводимых медицинских манипуляций заведующим подразделениями необходимо ежемесячно проводить анализ аварийных ситуаций, происходящих в отделениях и кабинетах, и в постоянном режиме обучать медицинский персонал правилам безопасной работы при медицинских манипуляциях, используя материалы анализа.

ВЫВОДЫ

1. Медицинский персонал лечебных учреждений округа, имеющий контакт с биологическими жидкостями пациентов, постоянно подвергается риску профессионального заражения гемоконтактными инфекциями.

2. В медицинских частях (подразделениях) и

учреждениях округа необходимо создать систему снижения риска профессионального заражения гемоконтактными инфекциями, регистрации и учёта аварийных ситуаций, а также обучения медицинского персонала действиям при них.

3. Перед санитарно-эпидемиологической службой Центрального военного округа стоит задача по совершенствованию эпидемиологического надзора за предупреждением внутрибольничных инфекций в военно-лечебных учреждениях, в том числе профессиональных заражений медицинского персонала.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. №52-ФЗ в редакции от 30 декабря 2001 г. №196-ФЗ.

2. Руководство по оценке профессионального риска для здоровья работников. Организационно-методические основы, принципы и критерии оценки (Р 2.2.1766-03). — Министерство здравоохранения РФ, 2003.

3. Акимкин В.Г. Организация противозаразительного режима в процедурных и перевязочных кабинетах клиничко-диагностических отделений: Метод. рекомендации / В.Г. Акимкин, А.В. Дмитриев, Е.В. Григорьева. — М.: ГВКГ имени Н.Н. Бурденко, 2005. — 67 с.

4. Письмо Министерства здравоохранения РФ «О профилактике внутрибольничных инфекций» от 24 марта 2003 г. №2510/2921-03-24.

5. Информационное письмо Управления здравоохранения Администрации города Екатеринбурга от 05.10.2005 г. №2202-20.

УДК 616.155.392.8: 612.6.052.4036.8-079

НО7

РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ПЯТИЛЕТНЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ И МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

*Евгений Владимирович Глуханюк**

*Уральская государственная медицинская академия, г. Екатеринбург,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова*

Реферат

Цель. Изучение мутаций в гене СЕВРА — транскрипционного фактора, играющего большое значение в миелоидной дифференцировке.

Методы. Материалом служили венозная кровь или пунктат костного мозга 16 образцов от больных острым миелобластным лейкозом. Метод исследования — полимеразная цепная реакция с последующим секвенированием.

Результаты. Полученные данные проанализированы, за больными ведётся активное наблюдение. Поскольку наиболее распространены и прогностически значимы комбинации N- и C-концевых мутаций, в случае выделения «горячих точек» (сочетаний определённых мутаций) мы сможем создать более доступный тест. Выделение групп пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом будет кардинально сказываться на тактике ведения больных: её радикальности, агрессивности и стоимости лечения.

Вывод. Незначительное количество обследуемых пока не позволяет говорить о статистически достоверной корреляции между определёнными мутациями и прогностической значимостью, а также выделить комбинации наиболее частых мутаций.

Ключевые слова: ген СЕВРА, мутация, генетический тест, острый миелоидный лейкоз.

DEVELOPMENT OF A GENETIC TEST FOR EVALUATING 5-YEAR SURVIVAL OF PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA AND MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME *E.V. Glukhanyuk. Ural State Medical Academy, Ekaterinburg, Russia, Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Moscow, Russia.* **Aim.** To study the mutations in

the gene *CEBPA* – a transcription factor that plays an important role in myeloid differentiation. **Methods.** Venous blood or bone marrow biopsy specimen samples from 16 patients with acute myeloid leukemia served as the materials for the study. The method of investigation – polymerase chain reaction followed by sequencing. **Results.** The obtained data was analyzed; the patients are under active surveillance. Since the most common and prognostically meaningful are the combinations of N- and C-terminal mutations, in the case of a «hot spots» detection (the combination of certain mutations) a more feasible test can be developed. Identifying groups of patients with favorable and unfavorable prognosis will dramatically affect the tactics of patient management: its radicalism, aggressiveness and cost of treatment. **Conclusion.** A small number of examinees does not yet make it possible to establish a statistically significant correlation between specific mutations and prognostic significance, as well as to identify the combinations of most frequent mutations. **Keywords:** gene *CEBPA*, mutation, genetic test, acute myeloid leukemia.

Генодиагностика острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) – актуальная проблема современной онкогематологии. В классификации миелоидных опухолей, предложенной Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) в 2001 г. [5], генетический критерий (наличие определённых мутаций в специфических генах) был впервые использован в качестве диагностического, а при пересмотре 2008 г. указанная классификационная категория была значительно углублена и расширена, в том числе за счёт мутаций, имеющих прогностическую значимость (оказывающих влияние на выживаемость) [8]. Так, показано, что мутации в генах *NPM1* и *CEBPA* ассоциированы с благоприятным прогнозом ОМЛ [1, 2, 7–9]. Наш выбор остановился на изучении мутаций в гене *CEBPA*. *CEBPA* (С/ЕВР α , семейство ССААТ/enhancer binding protein), представляющих собой транскрипционный фактор, который имеет большое значение в миелоидной дифференцировке. Он участвует в образовании комплекса из трёх транскрипционных факторов [*CEBPA*, *AML1*(*RUNX1*) и *CBFB*], ведущего к активации промотора гена макрофагального-гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (*MG-CSF*), который играет критическую роль в миелоидной дифференцировке [3, 4, 6]. При этом любые мутации генов, кодирующих белки данного комплекса, даже при отсутствии цитогенетически определяемых аномалий, ведут к формированию лейкоемического фенотипа, то есть нарушению дифференцировки и неконтрольной пролиферации. Тем не менее, в соответствии с классификацией ВОЗ пересмотра 2008 г. [8], обнаружение мутаций в гене *CEBPA* (биаллельных, двойных [7, 9]) позволяет stratифицировать больных в прогностически благоприятную группу даже в условиях проведения стандартной полихимиотерапии.

Если рассматривать доменную структуру фактора *CEBPA*, можно обнаружить функциональную неравнозначность N- и C-конца. На C-конце расположен домен с областью «лейциновой застёжки», благодаря которой происходят димеризация фактора и взаимодействие с дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), тогда как 50–75% N-части фактора несут трансактивационные TAD1 и TAD2 [4, 6].

Ген *CEBPA* расположен в локусе 19q13.1, картирован. Мутации в гене подразделяются на N- и C-терминальные – в зависимости от участка гена, кодирующего соответствующие участки фактора. N-терминальные нонсенс-мутации ведут к синтезу изоформ с неполноценными трансактивацион-

ными участками TAD1 и TAD2. Миссенс-мутации на C-конце в области bZIP-домена приводят к нарушению процесса димеризации (дефектная «лейциновая застёжка») или нарушению связывания с энхансерами (дефектная основная ДНК-связывающая область), также становясь причиной образования функционально дефектных изоформ. Что примечательно, наиболее часто встречаются сочетания N- и C-концевых мутаций, причём исследования последних лет показывают, что наибольшую прогностическую значимость имеют именно эти комбинации [3, 4, 6, 7, 9].

Несмотря на большое количество фундаментальных и трансляционных исследований, на сегодняшний день не создан алгоритм диагностики мутаций гена *CEBPA*, адаптированный для практического здравоохранения, а детекция всех мутаций (методом секвенирования) представляет собой дорогостоящий и требующий специального (также малодоступного) оборудования процесс. Следовательно, учитывая данные о наибольшей частоте и прогностической значимости комбинаций N- и C-концевых мутаций, в случае выделения «горячих точек» (сочетаний определённых мутаций) мы сможем создать тест, при использовании которого не понадобится прибегать к дорогостоящей и малодоступной методике секвенирования.

Таким образом, разрабатываемый нами тест позволит выделить группы пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом, определяя тактику ведения больных: радикальность, агрессивность и стоимость лечения.

Выделение тотальной рибонуклеиновой кислоты (РНК) проводили методом сорбции на силикагелевом носителе с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва) из 100 мкл цельной крови или 100 мкл костного мозга. Для проведения обратной транскрипции использовали набор «РЕВЕРТА-L-100» того же производителя. Участок гена *CEBPA*, включающий кодирующую часть первого экзона (последовательность нуклеотидов 81–1282), клонировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в виде двух перекрывающихся фрагментов с использованием двух пар праймеров – *CEB-F1*, *CEB-R1* и *CEB-F2*, *CEB-R2* (представлены в табл. 1). Позиции всех нуклеотидов указаны относительно кодирующей части гена *CEBPA* здорового человека (NM_004364 в GenBank).

Для проведения ПЦР готовили смесь, включающую следующие компоненты: 4 ед. ДНК-полимеразы («ДиаТак», ЦНИИ эпидемиологии, Москва), 2 мМ смесь дезоксирибонуклеотидтри-

Праймеры для амплификации и секвенирования части гена СЕВРА

Название	Последовательность	Область амплификации
CEB-F1	5' TCGCCATGCCGGGAGAАСТСТААС 3'	81-657 п.н.
CEB-R1	5' CTGGTAAGGGAAGAGGCCGGCCAG 3'	
CEB-F2	5' CCGCTGGTGTATCAAGCAGGA 3'	580-1282 п.н.
CEB-R2	5' CACGGCTCGGGCAAGCCTCGAGAT 3'	
CEB-SR1	5' AGCTGCTTGGCTTCATCCTCCT 3'	Секвенирование
CEB-SF2	5' CAAGGCCAAGAAGTCGGTGGACA 3'	Секвенирование

Примечание: п.н. — последовательность нуклеотидов.

фосфатов (дНТФ), 10 пМ каждого из двух праймеров, реакционный буфер [67 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 2,5 мМ MgCl₂]. Для обеих пар праймеров ПЦР проводили по следующей схеме: 1 цикл — 950 °С (3 мин); 42 цикла — 950 °С (20 с), 630 °С (20 с), 720 °С (40 с); заключительный цикл — 720 °С (5 мин).

Для анализа продуктов амплификации использовали электрофорез в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом транслилюминаторе.

Секвенирование ДНК проводили на автоматическом генетическом анализаторе «ABI Prism 310» («AppliedBiosystems», США) с использованием реакционной смеси «ABI Prism Big Dye TerminatorCycleSequencingKit v.3.0» («AppliedBiosystems», США) по прямой и обратной последовательностям (праймеры СЕВ-F1, СЕВ-F2, СЕВ-SF2 для прямой и праймеры СЕВ-SR1, СЕВ-R2 для обратной последовательности, см. табл. 1) согласно рекомендациям производителя. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием компьютерной программы «MEGA», версия 3.1 (Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004). Методика апробирована на клиническом материале (венозная кровь), полученном от здоровых людей, удалось определить первичную структуру описанной части гена СЕВРА. Первичная структура полностью совпадает с «диким типом» (NM_004364 NCBI GenBank).

Произведено секвенирование 16 образцов крови или пунктата костного мозга больных ОМЛ. Полученные данные проанализированы, за больными ведётся активное наблюдение.

ВЫВОДЫ

1. Незначительное количество обследуемых пока не позволяет говорить о статистически достоверной корреляции между определёнными мута-

циями и прогностической значимостью, а также выделить комбинации наиболее частых мутаций.

2. В дальнейшем мы планируем исследование полиморфизма, эпигеномных модификаций, мутаций в других генах и расширение методик детекции (использование модификаций ПЦР и других методов).

ЛИТЕРАТУРА

1. Boissel N., Renneville A., Biggio V. et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype // *Blood*. — 2005. — Vol. 106. — P. 3618-3620.
2. Falini B., Martelli M., Bolli N. et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? // *Blood*. — 2011. — Vol. 117. — P. 1109-1120.
3. Friedman A.D. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development // *Oncogene*. — 2002. — Vol. 21. — P. 3377-3390.
4. Frohling S., Dohner H. Disruption of C/EBPalpha function in acute myeloid leukaemia // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 351. — P. 2370-2372.
5. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H. et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. — Lyon, France: IARC, 2001. — 356 p.
6. Reckze K., Cammenga L. Molecular mechanisms underlying deregulation of C/EBPα in acute myeloid leukemia // *Intern. J. of Hematol.* — 2010. — Vol. 4. — P. 557-568.
7. Taskesen E., Bullinger L., Corbacioglu A. et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity // *Blood*. — 2011. — Vol. 117. — P. 2469-2475.
8. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes // *Blood*. — 2009. — Vol. 114. — P. 937-951.
9. Wouters J., Luwenberg B., Erpelinck-Verschueren C.A.J. et al. Brief report Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome // *Blood*. — 2009. — Vol. 113 — P. 3088-3091.