

КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА  
И ЛЕЧЕНИЕ МИЕЛОИДНЫХ  
ОПУХОЛЕЙ

MYELOID  
MALIGNANCIES

## Тактика выявления частых и редких типов химерного транскрипта *BCR-ABL* при хроническом миелоидном лейкозе

*О.В. Никулина*<sup>1,2</sup>, *Г.А. Цаур*<sup>1,2,3</sup>, *Т.О. Ригер*<sup>1,2</sup>,  
*Ю.А. Яковлева*<sup>1,2</sup>, *А.С. Демина*<sup>1,2</sup>, *Е.Р. Семенихина*<sup>1</sup>,  
*Т.В. Спильник*<sup>3</sup>, *Л.И. Савельев*<sup>1,2,3</sup>, *Л.Г. Фечина*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», ул. Серафимы Дерябиной, д. 32, Екатеринбург, Российская Федерация, 620149

<sup>2</sup> ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», ул. К. Маркса, д. 22а, Екатеринбург, Российская Федерация, 620026

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, ул. Репина, д. 3, Екатеринбург, Российская Федерация, 620219

## Diagnostic Strategy for Detection of Typical and Atypical *BCR-ABL* Fusion Gene Transcripts in Chronic Myeloid Leukemia

*O.V. Nikulina*<sup>1,2</sup>, *G.A. Tsaur*<sup>1,2,3</sup>, *T.O. Riger*<sup>1,2</sup>,  
*Yu.A. Yakovleva*<sup>1,2</sup>, *A.S. Demina*<sup>1,2</sup>, *E.R. Semikhina*<sup>1</sup>,  
*T.V. Spil'nik*<sup>3</sup>, *L.I. Savel'ev*<sup>1,2,3</sup>, *L.G. Fechina*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Regional Children's Hospital No. 1, 32 Serafimov Deryabinoy str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620149

<sup>2</sup> Research Institute of Medical Cell Technologies, 22a K. Marksa str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026

<sup>3</sup> Ural State Medical University under the Ministry of Health of the Russian Federation, 3 Repina str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620219

### РЕФЕРАТ

**Актуальность и цели.** Диагноз хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) считается установленным при обнаружении транслокации t(9;22)(q34;q11) цитогенетическим методом и/или выявлении химерного транскрипта *BCR-ABL* методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Известно, что у пациентов с ХМЛ наиболее часто проводится определение двух наиболее распространенных вариантов химерного транскрипта *BCR-ABL*: e13a2 (b2a2) и e14a2 (b3a2). Однако описаны и редкие варианты химерного транскрипта *BCR-ABL*, которые могут остаться незамеченными. Более того, своевременная диагностика и выявление различных вариантов химерного транскрипта представляются важной задачей, т. к. от строения химерного гена *BCR-ABL* может зависеть клиническое течение заболевания и эффективность проводимой терапии ингибиторами тирозинкиназ. Принимая во внимание, что в ряде случаев диагноз ХМЛ может быть установлен без стандартного цитогенетического исследования, только по данным ОТ-ПЦР, мы посчитали важным создать диагностический алгоритм, который позволял бы выявлять практически любой тип химерного транскрипта *BCR-ABL*.

**Методы.** С января 2004 г. по декабрь 2013 г. в лаборатории молекулярной биологии отдела детской онкологии и гематологии ОДКБ № 1 (г. Екатеринбург) диагноз ХМЛ был подтвержден у 1082 пациентов. Среди них было лиц мужского пола — 531 (49%), женского — 551 (51%). Медиана возраста составила 50 лет (диапазон 5–88 лет). Всем пациентам проведены стандартное цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследования. Праймеры, комплементарные нуклеотидной последовательности гена *ABL*, локализованы в экзонах 2 и 3 *ABL* и используются для выявления всех ти-

### ABSTRACT

**Background & Aims.** The diagnosis of chronic myeloid leukemia (CML) is confirmed in case of translocation t(9;22)(q34;q11) is revealed by chromosomal banding analysis and/or *BCR-ABL* fusion gene transcript is detected by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). However, rare types of chimeric *BCR-ABL* transcript have been described and they may be overlooked. Moreover, timely CML diagnosing and detection of different types of *BCR-ABL* transcript are very important task, because the clinical course of the disease and efficacy of the therapy with tyrosine kinase inhibitors partly depend on the structure of *BCR-ABL* fusion. In some cases CML may be diagnosed without the chromosomal banding analysis and be confirmed by RT-PCR alone, so we consider it important to develop a diagnostic algorithm that allows to detect virtually all types of *BCR-ABL* fusion gene transcript.

**Methods.** Over the period from January, 2004, till December, 2013, in the Molecular biology laboratory of Pediatric oncology and hematology center in Regional Children's Hospital # 1 (Yekaterinburg), the diagnosis of CML was confirmed in 1082 patients: 531 (49%) males and 551 (51%) females. The median age was 50 years (range 5–88 years). Chromosomal banding analysis and nested RT-PCR were performed in all patients. Reverse primers for nested RT-PCR are localized in exons 2 and 3 of *ABL* and are used for detection of all types of *BCR-ABL* transcript. Forward primers for typical e13a2 and e14a2 (M-bcr) transcripts are localized in exons 12 and 13 *BCR* gene, forward primers for e1a2 (m-bcr) transcript are complementary to exon 1 of *BCR*. While atypical amplicons are detected we performed Sanger sequencing with primers of the second round of RT-PCR and BigDye Terminator 3.1 kit.

пов транскриптов. Праймеры, комплементарные нуклеотидной последовательности гена *BCR*, локализуются либо в экзонах 12 и 13 для выявления наиболее типичных типов транскриптов e13a2, e14a2 (*M-bcr*), либо в экзоне 1 для обнаружения транскрипта e1a2 (*m-bcr*). При обнаружении ампликонов, отличных по размеру от e13a2, e14a2 и e1a2, проводилось их прямое секвенирование в двух направлениях с применением праймеров, использовавшихся во втором раунде гнездовой ОТ-ПЦР, и набора BigDye Terminator 3.1.

**Результаты.** Проанализировав данные 1082 пациентов с верифицированным диагнозом ХМЛ, мы разработали диагностический алгоритм выявления частых и редких типов химерного транскрипта *BCR-ABL* при ХМЛ с использованием метода ОТ-ПЦР. Используя данный алгоритм, мы выявили частые варианты *BCR-ABL* — e13a2 и e14a2 в 35,89 и 62,53 % случаев соответственно. На долю редких транскриптов — e13a3, e14a3, e19a2, e1a2, e3a2, e6a2, e8a2 — суммарно пришлось 1,57 % случаев.

**Заключение.** Предложенный диагностический алгоритм оказался эффективным для выявления частых и редких типов химерного транскрипта *BCR-ABL* у пациентов с ХМЛ.

**Ключевые слова:** хронический миелоидный лейкоз, молекулярная диагностика, химерный транскрипт *BCR-ABL*.

**Получено:** 31 декабря 2014 г.

**Принято в печать:** 4 февраля 2015 г.

*Для переписки:* Григорий Анатольевич Цаур, канд. мед. наук, ул. Серафимы Дерябиной, д. 32, Екатеринбург, Российская Федерация, 620149; тел.: +7(343)216-25-17; e-mail: tsaur@mail.ru

*Для цитирования:* Никулина О.В., Цаур Г.А., Ригер Т.О., Яковлева Ю.А., Демина А.С., Семенихина Е.Р., Спильник Т.В., Савельев Л.И., Фечина Л.Г. Тактика выявления частых и редких типов химерного транскрипта *BCR-ABL* при хроническом миелоидном лейкозе. *Клин. онкогематол.* 2015; 8(2): 161–168.

**Results.** Based on 1082 of confirmed CML cases we have developed a diagnostic strategy for detection of typical and atypical types of *BCR-ABL* fusion gene transcript in CML patients using RT-PCR. Proposed algorithm allowed to detect typical *BCR-ABL* transcript, e14a2 and e13a2, in 62.53 % and 35.89 % of cases, respectively. Atypical transcripts, e13a3, e14a3, e19a2, e1a2, e3a2, e6a2, and e8a2, were detected in 1.57 % of cases.

**Conclusion.** Therefore, the proposed diagnostic algorithm proved to be effective for detection of typical and atypical types of *BCR-ABL* fusion gene transcripts in CML patients.

**Keywords:** chronic myeloid leukemia, molecular diagnostics, typical and atypical *BCR-ABL* fusion gene transcripts.

**Received:** December 31, 2014

**Accepted:** February 4, 2015

*For correspondence:* Grigori Anatol'evich Tsaur, PhD, 32 Serafimiy Deryabinoy str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620149; Tel.: +7(343)216-25-17; e-mail: tsaur@mail.ru

*For citation:* Nikulina O.V., Tsaur G.A., Riger T.O., Yakovleva Yu.A., Demina A.S., Semikhina E.R., Spil'nik T.V., Savel'ev L.I., Fechina L.G. Diagnostic Strategy for Detection of Typical and Atypical *BCR-ABL* Fusion Gene Transcripts. *Klin. Onkogematol.* 2015; 8(2): 161–168 (In Russ.).

## ВВЕДЕНИЕ

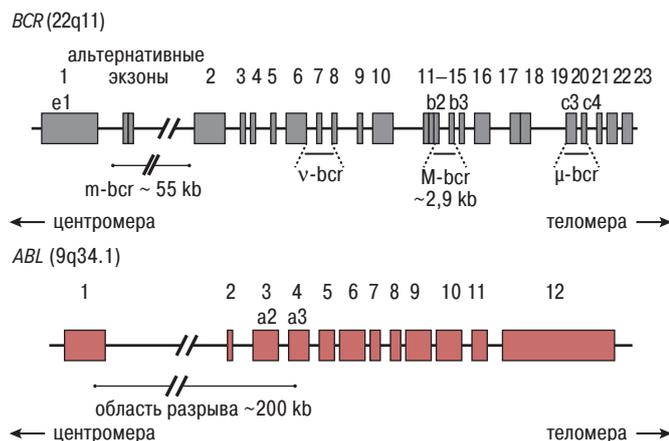
Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) — это клональное миелопролиферативное заболевание, в основе которого лежит реципрокная транслокация t(9;22)(q34.1;q11.2). В результате происходит слияние гена *ABL*, расположенного на длинном плече хромосомы 9, с геном *BCR*, расположенным на длинном плече хромосомы 22, и образование химерного гена *BCR-ABL*. Белок *BCR-ABL* играет ключевую роль в лейкозной трансформации клеток, т. к. обладает высокой тирозинкиназной активностью. Это приводит к активации сигнальных путей, способствующих увеличению пролиферативной активности клеток, ингибированию апоптоза, а также уменьшает зависимость клеток от внешних механизмов регуляции и снижает клеточную адгезию [1–4].

В зависимости от локализации точки разрыва могут возникать различные типы химерного транскрипта *BCR-ABL*. У подавляющего большинства пациентов с ХМЛ обнаруживают транскрипты e13a2 (b2a2) или e14a2 (b3a2), при этом точки разрыва в гене *BCR* располагаются в так называемом *major breakpoint cluster region* (*M-bcr*). В результате этой перестройки образуется цитоплазматический белок p210 с молекулярной массой 210 кДа. Значительно реже встречаются другие

типы химерных транскриптов, при которых точка разрыва локализуется в экзоне 1 гена *BCR* в так называемом *minor breakpoint cluster region* (*m-bcr*), что ведет к образованию химерного транскрипта e1a2 и продукции белка p190; в экзоне 19 гена *BCR* — *micro breakpoint cluster region* (*μ-bcr*) с образованием химерного транскрипта e19a2 и белка p230. Кроме того, встречаются точки разрыва в так называемой *variable breakpoint cluster region* (*v-bcr*), включающие в себя регион с 6-го по 8-й экзон гена *BCR*. При этом образуются химерные транскрипты e6a2 или e8a2, а продуцируемые белки обозначаются p185 и p200 соответственно. Также возможно образование химерных транскриптов с вовлечением экзона a3 гена *ABL* — e13a3 (b2a3), e14a3 (b3a3). Схематическое изображение структуры генов *BCR* и *ABL* приведено на рис. 1.

В зависимости от локализации точки разрыва заболевание может иметь различные клинические особенности. Известно, что пациенты с вариантом e1a2 или e6a2 имеют более агрессивное течение заболевания [6, 7], а наличие транскрипта e8a2 может обуславливать резистентность к терапии интерфероном-α [8]. В то же время вариант e19a2 относят к прогностически благоприятным [9, 10].

Диагноз ХМЛ считается установленным при обнаружении транслокации t(9;22)(q34;q11) цитогенетическим методом и/или при выявлении химерного транскрипта



**Рис. 1.** Схематическое изображение структуры генов *ABL* и *BCR* (цит. по [5])

**Fig. 1.** Chart of *ABL* and *BCR* gene structures (cited according to [5])

*BCR-ABL* методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [11]. У пациентов с ХМЛ наиболее часто проводят определение двух (иногда трех) наиболее распространенных вариантов химерного транскрипта *BCR-ABL*: e13a2, e14a2 и e1a2. Однако, если у пациента точка разрыва локализуется в нетипичном месте, это может привести к ложноотрицательному результату ОТ-ПЦР и, как следствие, к некорректному диагнозу.

**Цель работы** — разработать диагностический алгоритм выявления частых и редких типов химерного транскрипта *BCR-ABL* при ХМЛ с использованием методов клинической лабораторной диагностики и молекулярной биологии.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период с января 2004 г. по декабрь 2013 г. в лаборатории молекулярной биологии отдела детской онкологии и гематологии ОДКБ № 1 (г. Екатеринбург) диагноз ХМЛ был подтвержден у 1082 пациентов. Среди них было лиц мужского пола — 531 (49 %), женского — 551 (51 %). Медиана возраста составила 50 лет (диапазон 5–88 лет). Всем пациентам проведены стандартное цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследования. РНК выделяли из цельной крови по методу Хомчинского с

использованием TRI reagent WB (Sigma-Aldrich, США) и последующей обработкой ДНКазой I (Fermentas, Латвия). Качество выделенной РНК оценивали методом капиллярного электрофореза с использованием Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Германия). В дальнейший анализ брали образцы с показателем целостности РНК > 4,2 [12]. Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 60 мин при температуре 37 °С с 200 ед. *M-MLV* обратной транскриптазы (Promega, Германия) в присутствии смеси случайных гекса- или наномеров («Синтол», Россия). Для стабилизации РНК перед началом реакции обратной транскрипции ее смешивали с ингибитором РНКаз RNasin (Promega, Германия). Гнездную ОТ-ПЦР проводили на амплификаторе Gene Amp PCR System 9700 Gold (Applied Biosystems, США) с ДияТак-полимеразой («Амплиценс», Россия). Программа амплификации: 1 раунд гнездной ПЦР 94 °С — 2 мин; 35 циклов: 94 °С — 15 с, 64 °С — 45 с, 72 °С — 45 с, 72 °С — 6 мин. 2-й раунд гнездной ПЦР: 94 °С — 2 мин; 25 циклов: 94 °С — 15 с, 64 °С — 45 с, 72 °С — 45 с, 72 °С — 6 мин. Для исключения ложноотрицательных результатов одновременно с выявлением типа химерного транскрипта *BCR-ABL* проводилось определение фрагмента гена *ABL*, что служило контролем выделения РНК. Для выявления химерных транскриптов e19a2, e6a2, e8a2 применялась одностадийная ПЦР, программа амплификации которой соответствует первому раунду гнездной ПЦР, описанному выше.

Праймеры, комплементарные нуклеотидной последовательности гена *ABL*, локализуются в экзонах 2 и 3 *ABL* и используются для выявления всех типов транскриптов. Праймеры, комплементарные нуклеотидной последовательности гена *BCR*, локализуются либо в экзонах 12 и 13 для выявления наиболее типичных типов транскриптов e13a2, e14a2 (*M-bcr*) (оба типа транскрипта определяются в процессе одной гнездной ОТ-ПЦР), либо в экзоне 1 для обнаружения транскрипта e1a2 (*m-bcr*). При использовании этих праймеров также определяются транскрипты с точкой разрыва в зонах *μ-bcr* (с праймерами для *M-bcr*) и *ν-bcr* (с праймерами для *m-bcr*). При детекции в 2% агарозном геле они определяются как высокомолекулярные продукты. Для подтверждения обнаружения этих транскриптов дополнительно использовались праймеры с локализацией в экзонах 6 и 18 гена *BCR* соответственно. Последовательности праймеров и их локализация приведены в табл. 1.

**Таблица 1.** Нуклеотидная последовательность праймеров и их локализация в генах *ABL* (NM\_005157.5) и *BCR* (NM\_004327.3)

| Тип транскрипта            | Название праймера         | Нуклеотидная последовательность (5'-3') | Ген        | Экзон  | Локализация по отношению к транскрипту гена |
|----------------------------|---------------------------|---|------------|--------|---|
| e13a2, e14a2, e13a3, e14a3 | Прямой праймер (ПЦР 1)*   | ССТСТGACTATGAGCGTGCAGAGT                | <i>BCR</i> | 12     | 3142–3165                                   |
|                            | Обратный праймер (ПЦР 1)* | СCAGACTGTTGACTGGCGTGATGT                | <i>ABL</i> | 3      | 559–536                                     |
|                            | Прямой праймер (ПЦР 2)*   | AGAAGTGTTTCAGAAAGCTTCTCCCT              | <i>BCR</i> | 12, 13 | 3193–3217                                   |
|                            | Обратный праймер (ПЦР 2)* | TTCACACCATTCGCCATTGTGATT                | <i>ABL</i> | 3      | 495–472                                     |
| e1a2, e3a2                 | Прямой праймер (ПЦР 1)*   | СCAGAGTCCTTCGACAGCAGCAGT                | <i>BCR</i> | 1      | 1721–1742                                   |
|                            | Обратный праймер (ПЦР 1)* | СCAGACTGTTGACTGGCGTGATGT                | <i>ABL</i> | 3      | 559–536                                     |
|                            | Прямой праймер (ПЦР 2)*   | ATGACGAGGGCGCCTTCCATGGAG                | <i>BCR</i> | 1      | 1850–1869                                   |
|                            | Обратный праймер (ПЦР 2)* | TTCACACCATTCGCCATTGTGATT                | <i>ABL</i> | 3      | 495–472                                     |
| e6a2, e8a2                 | Прямой праймер**          | ССТGAGAGCCAGAAGCAACAAAGATGCC            | <i>BCR</i> | 6      | 2459–2486                                   |
|                            | Обратный праймер**        | СCATTGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG           | <i>ABL</i> | 3      | 482–454                                     |
| e19a2                      | Прямой праймер**          | ACTGAAGGCAGCCTTCGACGTC                  | <i>BCR</i> | 19     | 3896–3917                                   |
|                            | Обратный праймер**        | СCATTGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG           | <i>ABL</i> | 3      | 482–454                                     |
| Контрольный ген <i>ABL</i> | Прямой праймер            | СGGCCAGTAGCATCTGACTTTG                  | <i>ABL</i> | 2      | 283–304                                     |
|                            | Обратный праймер          | ССТTGGCCATTTTGGTTTGG                    | <i>ABL</i> | 3      | 518–498                                     |

\* Приводится в работе S. Schliben et al. [36].

\*\* Приводится в работе T. Burmeister et al. [33].

**Таблица 2.** Размеры ПЦР-продуктов различных типов транскрипта химерного гена *BCR-ABL*

| Тип транскрипта | Размер ПЦР-продукта, п. н. |
|-----------------|----------------------------|
| e13a2           | 335                        |
| e14a2           | 410                        |
| e13a3           | 161                        |
| e14a3           | 236                        |
| e1a2            | 254                        |
| e19a2           | 234                        |

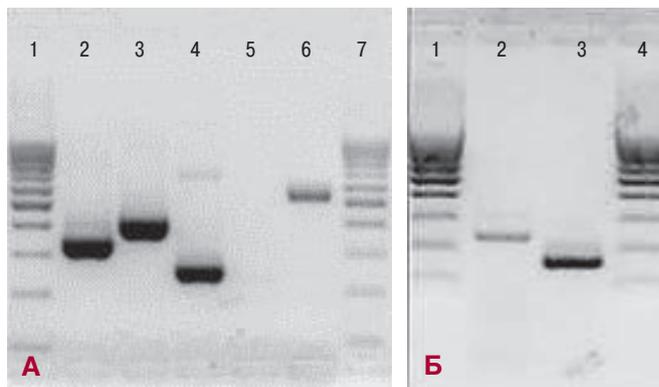
п. н. — пары нуклеотидов.

Детекция ПЦР-продуктов проводилась методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле. Размеры продуктов амплификации указаны в табл. 2.

При обнаружении ПЦР-продуктов, отличных по размеру от e13a2, e14a2 и e1a2, проводилось их прямое секвенирование в двух направлениях на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США) с применением праймеров, использовавшихся во втором раунде гнездовой ОТ-ПЦР, и набора BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Транскрипты e13a2 и e14a2 были выявлены у 1064 (98,34 %) пациентов. При этом e14a2 был обнаружен заметно чаще по сравнению с e13a2 ( $n = 676, 62,48 \%$ , и  $n = 388, 35,86 \%$ , соответственно). Другие типы транскриптов *BCR-ABL* обнаружены у 14 пациентов: e1a2 — у 7 (0,65 %), e19a2 — у 5 (0,46 %), e6a2 — у 2 (0,18 %). По 1 (0,09 %) пациенту имели варианты e8a2, e3a2,

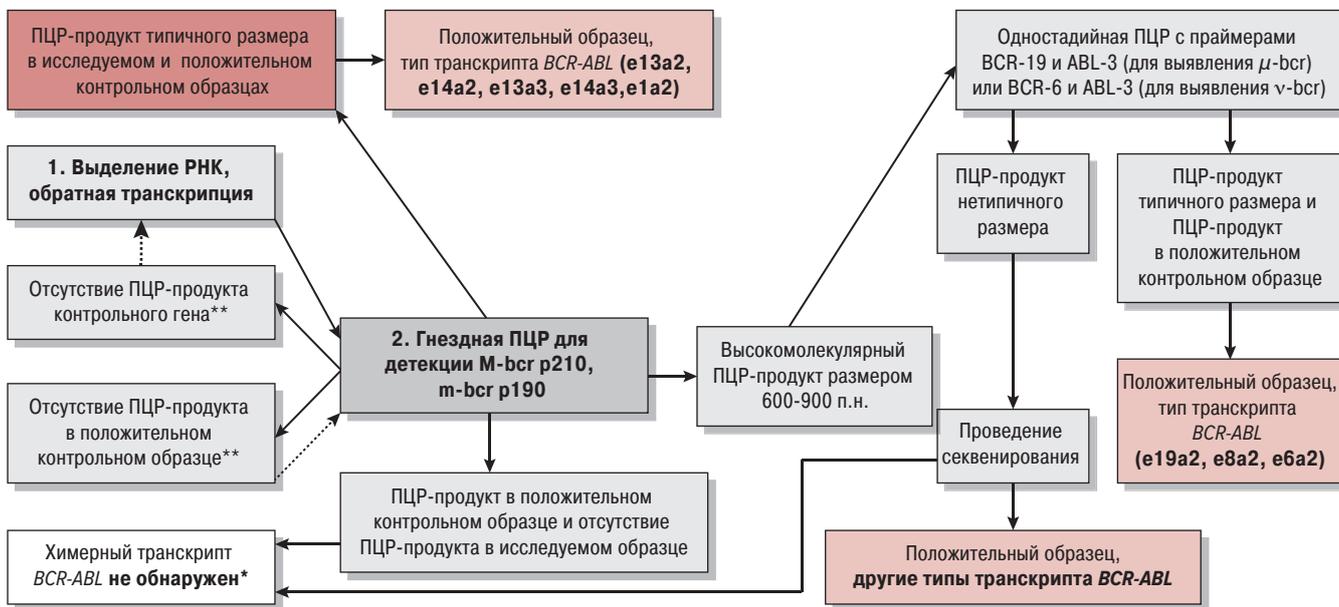


**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации различных типов транскриптов химерного гена *BCR-ABL*: А: 1, 7 — маркер размером 100 пар нуклеотидов; 2 — химерный транскрипт e13a2; 3 — e14a2; 4 — e1a2; 5 — негативный контроль; 6 — e8a2; Б: 1 — маркер размером 100 пар нуклеотидов; 2 — e19a2; 3 — e13a3

**Fig. 2.** Electrophoregram of amplification products of different types of *BCR-ABL* fusion gene transcripts: А: 1, 7 — DNA marker of 100 base pairs; 2 — *BCR-ABL* transcript e13a2; 3 — e14a2; 4 — e1a2; 5 — negative control; 6 — e8a2; Б: 1 — DNA marker of 100 base pairs; 2 — e19a2; 3 — e13a3

e13a3, e14a3. На рис. 2 представлена электрофореграмма продуктов амплификации различных типов химерных транскриптов.

Разработанный нами алгоритм выявления частых и редких типов химерного транскрипта *BCR-ABL* при ХМЛ приведен на рис. 3. При его разработке мы руководствовались следующими принципами:



**Рис. 3.** Диагностический алгоритм выявления вариантов химерного транскрипта *BCR-ABL*. Цифрами 1 и 2 отмечены два первых обязательных шага проведения анализа. Дальнейшая последовательность действий зависит от результата шага 2

п. н. — пары нуклеотидов.

\* В образце не обнаружены следующие типы химерного транскрипта *BCR-ABL*: e13a2, e14a2, e13a3, e14a3, e1a2, e3a3, e19a2, e8a2, e6a2.

\*\* Пунктирной стрелкой обозначены этапы, которые необходимо повторить в случае получения некорректных результатов.

**Fig. 3.** Diagnostic algorithm for detection of different types of the *BCR-ABL* fusion gene transcript. First two obligatory steps of the analysis are marked with 1 and 2. The subsequent procedure depends on results of step 2

\* The following types of the *BCR-ABL* fusion gene transcript were not found in the sample: e13a2, e14a2, e13a3, e14a3, e1a2, e3a3, e19a2, e8a2, and e6a2.

\*\* The dotted arrow points to steps required in case of incorrect results.

а) с помощью алгоритма должны выявляться типичные варианты химерного транскрипта: e13a2, e14a2, e1a2;

б) используемые праймеры должны быть подобраны таким образом, чтобы определялось большинство редких вариантов, включая e19a2, e6a2, e8a2, e3a2, e13a3, e14a3;

в) варианты транскрипта с локализацией точки разрыва в нетипичном месте должны отличаться от трех основных вариантов размером ПЦР-продуктов;

г) для исключения ложноотрицательных результатов в образце должен определяться контрольный ген *ABL*.

Для подтверждения обнаружения редких транскриптов мы рекомендуем проводить дополнительную ПЦР, используя праймеры, комплементарные предполагаемой области разрыва. В случае обнаружения транскриптов, не входящих в зоны  $\mu$ -bcr или  $\nu$ -bcr, целесообразно проводить секвенирование.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные о преобладании частоты химерного транскрипта e14a2 над e13a2 были подтверждены и в ранее опубликованных работах. В то же время в исследованиях, посвященных выявлению редких типов химерного транскрипта *BCR-ABL*, чаще всего приводятся ограниченные группы пациентов, что затрудняет корректную интерпретацию полученных результатов и приводит к неверной оценке их частоты. Так, в работе N. Tabassum и соавт. среди 25 исследованных образцов было выявлено 8 (32 %) с наличием транскрипта e13a2 и 15 (60 %) с транскриптом e14a2. В 1 (4 %) наблюдении обнаружена коэкспрессия транскриптов e14a2/e13a2, в другом — вариант e1a3 (4 %) [13]. M. Yaghmaie и соавт., изучавшие больных ХМЛ в Иране, выявили вариант e13a2 у 15 (20 %) пациентов, e14a2 — у 47 (62,6 %). Коэкспрессия транскриптов e14a3/e13a2 была обнаружена у 2 (2,6 %) пациентов, транскрипт e1a2 — у 1 (1,3 %), вариант e14a3/e13a3 — у 7 (9,3 %), транскрипт e19a2 — у 3 (4,0 %) [14]. H.-G. Goh и соавт. опубликовали данные о частоте различных типов транскриптов в корейской популяции при обследовании 548 больных ХМЛ. Транскрипт e13a2 был выявлен у 174 (31,7 %) пациентов, e14a2 — у 364 (66,4 %). Кроме того, установлено 4

(0,7 %) пациента с вариантом e19a2, 2 (0,4 %) — с одновременным присутствием транскриптов e13a2 и e14a2, по 1 (0,2 %) пациенту с вариантами e13a3, e1a3 и e1a1 [15]. В японской популяции T. Ito и соавт. выявили e13a2 у 38 (30,2 %) пациентов, e14a2 — у 85 (67,5 %), e13a3 — у 1 (0,8 %), e19a2 — у 2 (1,6 %) [16]. По данным A. Vennour и соавт., из 45 пациентов в Тунисе у 28 (62,2 %) обнаружен транскрипт e14a2, у 16 (35,6 %) — e13a2 и у 1 (2,2 %) — e19a2 [17].

Своевременная диагностика и обнаружение различных вариантов химерного транскрипта представляются важной задачей, т. к. от строения химерного гена *BCR-ABL* может зависеть клиническое течение заболевания и эффективность терапии ингибиторами тирозинкиназ.

Как уже отмечалось ранее, тип транскрипта e19a2 относится к прогностически благоприятным. Клинически это проявляется умеренным лейкоцитозом, анемией и спленомегалией. Прогрессирование заболевания с переходом в фазу бластного криза отмечается редко [18]. К прогностически неблагоприятным относят транскрипты e1a2, e6a2. В табл. 3 представлены результаты ответа на лечение ингибиторами тирозинкиназ пациентов с вариантом e6a2 химерного транскрипта *BCR-ABL*. Среди обследованных нами больных вариант e6a2 был обнаружен у 2 пациентов мужского пола, что соответствует данным литературы о выявлении этого типа химерного транскрипта преимущественно у мужчин [19–24].

Прямое соединение между экзоном 8 гена *BCR* и экзоном 2 гена *ABL* приводит к образованию стоп-кодона (UAG) [25]. В связи с этим для образования белка p200 химерный транскрипт e8a2 должен содержать в себе вставки различной протяженности, представляющие собой участки *ABL*, *BCR* или других генов [26–31]. Более чем в половине ранее описанных случаев встречается вставка размером 55 пар нуклеотидов (п. н.) инвертированного фрагмента интрона Ib гена *ABL* [32]. В табл. 4 приведены различные варианты функционально активного транскрипта e8a2. В выявленном нами случае при проведении секвенирования было показано, что химерный ген содержит инвертированный (развернутый на 180° по отношению к нормальной последовательности фрагмент гена) фрагмент интрона

**Таблица 3.** Ответ на лечение ингибиторами тирозинкиназ пациентов с вариантом e6a2 химерного транскрипта *BCR-ABL*

| № Пациент | Пол/возраст, лет | Время наблюдения, мес. | Продолжительность жизни без событий, мес. | Время до прогрессирования, мес. | Исход | Источник                                 |                           |
|-----------|------------------|------------------------|---|---------------------------------|-------|--|---------------------------|
|           |                  |                        |   |                                 |       |  | Наилучший ответ           |
| 1*        | М/42             | 47                     | ПГО                                       | 11                              | 11    | Миелосаркома/смерть                      | H.K. Vefring et al. [19]  |
| 2**       | М/48             | 63                     | ПГО                                       | 5                               | 7     | Остается под наблюдением/e6a2 не выявлен |                           |
| 3         | М/48             | 10                     | —   | 0                               | 6     | БК/смерть                                | S. Schnittger et al. [20] |
| 4***      | М/57             | ?                      | —   | 0                               | 3     | Грибковый сепсис/смерть                  | K.A. Beel et al. [7]      |
| 5         | М/65             | 1,5                    | ПГО                                       | 1,5                             | —     | Пневмония/смерть                         | B. Schultheis et al. [22] |
| 6         | М/37             | 21                     | ?   | 21                              | —     | Остается под наблюдением                 | G. Roti et al. [24]       |
| 7         | М/43             | 15                     | ПЦГО                                      | 15                              | —     | Остается под наблюдением/ПЦГО            | M. Breccia et al. [21]    |
| 8         | М/67             | 18                     | ПЦГО                                      | 18                              | —     | Остается под наблюдением/ПЦГО            | C. Popovici et al. [23]   |

аллоТГСК — аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; БК — бластный криз; ПГО — полный гематологический ответ; ПЦГО — полный цитогенетический ответ.

\* АллоТГСК через 14 мес.

\*\* Фаза акселерации. АллоТГСК через 12 мес.

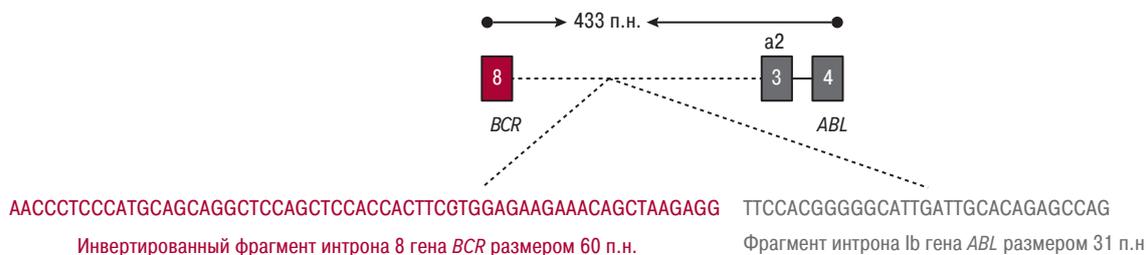
\*\*\* Фаза акселерации. АллоТГСК.

**Таблица 4.** Исходные характеристики и ответ на лечение пациентов с хроническим миелолейкозом и наличием химерного транскрипта eвa2 гена *BCR-ABL*

| №  | Строение химерного гена <i>BCR-ABL</i>   | Пол/возраст, лет | Фаза ХМЛ           | Лейкоциты,                   |                 |                        | Тромбоциты,     |                        |  | Наилучший ответ           | Источник |
|----|--|------------------|--------------------|------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|------------------------|--|---------------------------|----------|
|    |  |                  |                    | Спленомегалия                | Гемоглобин, г/л | $\times 10^9/\text{л}$ | Гемоглобин, г/л | $\times 10^9/\text{л}$ | Лечение*                                       |                           |          |
| 1  | eв-ins*-a2<br>* Инвертированный фрагмент 55 п. н. интрона Iв гена <i>ABL</i> .   | М/56             | Хроническая        | Да                           | НД              | НД                     | НД              | НД                     | ПГО  | S. Demehri et al. [8]     |          |
| 2  | eв-ins*-a2<br>* Фрагмент 151 п. н. интрона Ia гена <i>ABL</i> .  | Ж/75             | Хроническая        | Да (2 см ниже реберной дуги) | 116             | 125                    | 569             | 569                    | ПГО  |                           |          |
| 3  | eв-ins*-a2<br>* Фрагмент 91 п. н. гена <i>KIAA0376</i> .   | Ж/46             | Хроническая        | Нет                          | 102             | 146                    | 583             | 583                    | ЧГО  |                           |          |
| 4  | eв*-ins**<br>* Точка разрыва в экзоне 8 гена <i>BCR</i> .<br>** Инвертированный фрагмент 15 п. н. интрона Iв гена <i>ABL</i> .                   | Ж/45             | Хроническая        | Нет                          | 117             | 4,65                   | 531             | 531                    | НД   |                           |          |
| 5  | eв-ins*-a2<br>* Инвертированный фрагмент 55 п. н. интрона Iв гена <i>ABL</i> .   | М/55             | Хроническая        | Да (7 см ниже реберной дуги) | 139             | 143                    | 396             | 396                    | ПГО  | S. Branford et al. [25]   |          |
| 6  | eв-ins*-a2<br>* Инвертированный фрагмент 55 п. н. интрона Iв гена <i>ABL</i> .   | Ж/69             | Хроническая        | Да                           | 120             | 20                     | 879             | 879                    | ЧГО  | T. Sugimoto et al. [28]   |          |
| 7  | eв-ins*-a2<br>* Точка разрыва в экзоне 8 гена <i>BCR</i> в положении 2665.<br>** Инвертированный фрагмент 31 п. н. интрона Iв гена <i>ABL</i> .  | Ж/56             | Хроническая        | Нет                          | 150             | 15,6                   | 216             | 216                    | ПГО  | G. Martinelli et al. [29] |          |
| 8  | eв*-a2<br>* Точка разрыва в экзоне 8 гена <i>BCR</i> в положении 2664.   | М/51             | Хроническая        | Нет                          | 125             | 42                     | 1123            | 1123                   | ПГО  | G. How et al. [30]        |          |
| 9  | eв-ins*-a2**<br>* Инвертированный фрагмент гена 60 п. н. интрона 8 гена <i>BCR</i> .<br>** Фрагмент из 14 п. н. интрона Iв гена <i>ABL</i> .     | М/46             | Хроническая        | Да                           | 130             | 46,2                   | 663             | 663                    | ПГО  | I.J. Park et al. [32]     |          |
| 10 | eв-ins*-a2<br>* Фрагмент из 16 п. н. интрона Iв гена <i>ABL</i> .  | Ж/40             | Хроническая        | Да                           | 90              | 15,0                   | 1500            | 1500                   | ПГО  | Y.Z. Qin et al. [31]      |          |
| 11 | eв*-a2**<br>* Инвертированный фрагмент 60 п. н. интрона 8 гена <i>BCR</i> .<br>** Инвертированный фрагмент 31 п. н. интрона Iв гена <i>ABL</i> . | Ж/62             | Ранняя хроническая | НД                           | НД              | 160                    | НД              | НД                     | ПЦГО+ транскрипт eвa2 не выявлен в ходе ОТ-ПЦР | Настоящее исследование    |          |

ins — вставка; НД — нет данных; ПГО — полный гематологический ответ; ПЦГО — полный цитогенетический ответ; ЧГО — частичный гематологический ответ.

\* Ряд пациентов не получали терапии ингибиторами тирозинкиназ, т. к. лечились в конце 1990-х — начале 2000-х годов.



**Рис. 4.** Схематичное изображение химерного транскрипта *BCR-ABL* e8a2 пациентки Г., выявленный методом прямого секвенирования п. н. — пары нуклеотидов.

**Fig. 4.** Chart of patient G.'s *BCR-ABL* fusion gene transcript e8a2 detected by direct sequencing method п. н. — base pairs.

8 гена *BCR* размером 60 п. н. и фрагмент интрона 1b гена *ABL* размером 31 п. н. (рис. 4).

На основании данных ранее опубликованных работ оценить частоту редких вариантов химерных транскриптов *BCR-ABL* не представляется возможным. Связано это как с малым числом наблюдений по данным литературы, так и с отсутствием полноценной стратегии выявления всех возможных вариантов транскриптов. Описания специальных технологий обнаружения наряду с частыми и редкими транскриптов *BCR-ABL* встречаются лишь в единичных работах [15, 33]. Принимая во внимание это обстоятельство, а также исходя из того, что диагноз ХМЛ может быть установлен без стандартного цитогенетического исследования, только по данным ОТ-ПЦР, мы создали диагностический алгоритм, с помощью которого можно выявить практически любой тип химерного транскрипта *BCR-ABL*. Мы считаем, что применение этого алгоритма поможет увеличить частоту определения редких вариантов химерных транскриптов и позволит уже на начальном этапе оценить прогноз заболевания. Кроме того, появится возможность оценивать динамику клиренса *BCR-ABL* у этой категории пациентов при применении ингибиторов тирозинкиназ по аналогии с системой, уже используемой при обнаружении типичных транскриптов *BCR-ABL* (e13a2, e14a2) [34, 35].

Одновременно с этим считаем важным отметить, что лабораторная диагностика ХМЛ имеет множество «подводных камней», к числу которых можно отнести не только редкие типы транскрипта *BCR-ABL*, но и нетипичные механизмы образования транслокации t(9;22)(q34;q11), включая варианты и криптические формы данной аберрации. В связи с этим верификация ХМЛ должна выполняться в специализированных лабораториях, располагающих максимально широким спектром методов клинической лабораторной диагностики и молекулярной биологии, включая стандартную цитогенетику, флуоресцентную гибридизацию *in situ*, различные варианты ПЦР, секвенирование.

## ВЫВОДЫ

1. Предложенный нами диагностический алгоритм позволяет выявлять частые и редкие типы химерного транскрипта *BCR-ABL* методом гнездовой ОТ-ПЦР.
2. Наиболее часто встречаются варианты e13a2 (35,89 %) и e14a2 (62,53 %) химерного транскрипта *BCR-ABL*.
3. К числу редких транскриптов *BCR-ABL* относятся e13a3, e14a3, e19a2, e1a2, e3a2, e6a2, e8a2. Доля редких транскриптов *BCR-ABL* составила 1,57 %.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** Г.А. Цаур, Л.И. Савельев, Л.Г. Фечина.

**Сбор и обработка данных:** Г.А. Цаур, О.В. Никулина, Т.О. Ригер, Ю.А. Яковлева, А.С. Демина, Е.Р. Семенихина, Т.В. Спильник.

**Предоставление материалов исследования:** Г.А. Цаур, О.В. Никулина, Т.О. Ригер, Ю.А. Яковлева, А.С. Демина, Е.Р. Семенихина.

**Анализ и интерпретация данных:** Г.А. Цаур, О.В. Никулина.

**Подготовка рукописи:** Г.А. Цаур, О.В. Никулина, Л.И. Савельев, Л.Г. Фечина.

**Окончательное одобрение рукописи:** Г.А. Цаур, О.В. Никулина, Т.О. Ригер, Ю.А. Яковлева, А.С. Демина, Е.Р. Семенихина, Т.В. Спильник, Л.И. Савельев, Л.Г. Фечина.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Nowell P.C., Hungerford D.A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 1960; 25: 85–109.
2. Rowley J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973; 243: 290–3.
3. Телегеев Г.Д., Дубровская А.Н., Дыбков М.В. и др. Роль белка BCR-ABL в лейкогенезе. *Экспериментальная онкология.* 1999; 21: 182–94. [Telegueev G.D., Dubrovskaya A.N., Dybkov M.V. et al. The role of BCR-ABL protein in leukomogenesis. *Eksperimental'naya onkologiya.* 1999; 21: 182–94. (In Russ.)]
4. Туркина А.Г., Чельшева Е.Ю. Стратегия терапии хронического миелолейкоза: возможности и перспективы. *Терапевтический архив.* 2013; 85(7): 4–9. [Turkina A.G., Chelysheva E.Yu. Therapeutic strategy for chronic myeloid leukemia: potentials and prospects. *Terapevticheskii arkhiv.* 2013; 85(7): 4–9. (In Russ.)]
5. Dongen van J.J.M., Macintyre E.A., Gabert J.A. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia.* 1999; 13(12): 1901–28.
6. Verma D., Kantarjian H.M., Jones D. et al. Chronic myeloid leukemia (CML) with P190 BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood.* 2009; 114: 2232–5.
7. Beel K.A., Lemmens J., Vranckx H. et al. CML with e6a2 BCR-ABL1 transcript: an aggressive entity? *Ann. Hematol.* 2011; 90: 1241–3.
8. Demehri S., Paschka P., Schultheis B. et al. e8a2 BCR-ABL: more frequent than other atypical BCR-ABL variants? *Leukemia.* 2005; 19: 681–4.

9. Martin S.E., Sausen M., Joseph A., Kingham B.F. Chronic myeloid leukemia with e19a2 atypical transcript: early Imatinib resistance and complete response to dasatinib. *Cancer Gen. Cytogen.* 2010; 201(2): 133–4.
10. Langabeer S.E., McCarron S.L., Carrol P. et al. Molecular response to first line nilotinib in a patient with e19a2 BCR-ABL 1 chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 2011; 35: 169–70.
11. Baccarani M., Deininger M., Rosti G. et al. European Leukemia Net Recommendations for the Management of Chronic Myeloid Leukemia: 2013. *Blood.* 2013; 122(6): 872–84.
12. Цаур Г.А., Друй А.Е., Попов А.М. и др. Возможность использования микроструйных биочипов для оценки качества и количества РНК у пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2011; 4(37): 107–11. [Tsauro G.A., Druy A.E., Popov A.M. et al. Microfluidic biochips for RNA quantity and quality evaluation in patients with oncological and oncohematological disorders. *Vestnik Ural'skoi meditsinskoi akademicheskoi nauki.* 2011; 4(37): 107–11. (In Russ.)]
13. Tabassum N., Saboor M., Moinuddin M. et al. Heterogeneity of BCR-ABL rearrangement in patients with chronic myeloid leukemia in Pakistan. *Pakist. J. Med. Sci.* 2014; 30(4): 850–3.
14. Yaghmaie M., Seyed H., Ghaffari H. et al. Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. *Arch. Iran. Med.* 2008; 11(3): 247–51.
15. Goh H.-G., Hwang J.-Y., Kim S.-H. et al. Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR. *Transl. Res.* 2006; 148(5): 249–56.
16. Ito T., Tanaka H., Tanaka K. et al. Insertion of a genomic fragment of chromosome 19 between BCR intron 19 and ABL intron 1a in a chronic myeloid leukaemia patient with BCR-ABL (e19a2) transcript. *Br. J. Haematol.* 2004; 126: 750–5.
17. Bennour A., Ouahchi I., Achour B. et al. Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. *Med. Oncol.* 2013; 30: 348.
18. Pane F., Frigeri F., Sindona M. et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR-ABL with C3/A2 Junction). *Blood* 1996; 88 (7): 2410–2414.
19. Vefring H.K., Gruber F.X.E., Wee L. et al. Chronic myelogenous leukemia with the e6a2 BCR-ABL and lacking Imatinib response: presentation of two cases. *Acta Haematol.* 2009; 122: 11–6.
20. Schnittger S., Bacher U., Kern W. et al. A new case with rare e6a2 BCR-ABL fusion transcript developing two new resistance mutations during imatinib mesylate, which were replaced by T315I after subsequent dasatinib treatment. *Leukemia.* 2008; 22: 856–88.
21. Breccia M., Cannella L., Diverio D. et al. Isolated thrombocytosis as first sign of chronic myeloid leukemia with e6a2 BCR/ABL fusion transcript, JAK2 negativity and complete response to Imatinib. *Leuk. Res.* 2008; 32: 177–80.
22. Schultheis B., Wang L., Clark R.E. et al. BCR-ABL with an e6a2 fusion in a CML patient diagnosed in blast crisis. *Leukemia.* 2003; 17: 2054–5.
23. Popovici C., Cailleres S., David M. et al. e6a2 BCR-ABL fusion with BCR exon 5-deleted transcript in a Philadelphia positive CML responsive to Imatinib. *Leuk. Lymphoma.* 2005; 46(9): 1375–7.
24. Roti G., Starza R., Gorello P. et al. e6a2 BCR/ABL1 fusion with cryptic der(9)t(9;22) deletions in a patient with chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 2005; 90: 1139–41.
25. Branford S., Rudzki Z., Hughes T.P. A novel BCR-ABL transcript (e8a2) with the insertion of an inverted sequence of ABL intron 1 b in a patient with Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2000; 109: 635–7.
26. Cayuela J.-M., Rousselot P., Nicolini F. et al. Identification of a rare e8a2 BCR-ABL fusion gene in three novel chronic myeloid leukemia patients treated with Imatinib. *Leukemia.* 2005; 19: 2234–6.
27. Tchirkov A., Couderc J.-L., Perissel B. et al. Major molecular response to imatinib in a patient with chronic myeloid leukemia expressing a novel form of e8a2 BCR-ABL transcript. *Leukemia.* 2006; 20: 167–8.
28. Sugimoto T., Ijima K., Hisatomi H. et al. Second case of CML with aberrant BCR-ABL fusion transcript (e8/a2) with insertion of an inverted ABL intron 1b sequence. *Am. J. Haematol.* 2004; 77: 164–6.
29. Martinelli G., Terragna C., Amabile M. et al. Alu and translin recognition site sequences flank translocation sites in a novel type of chimeric BCR-ABL transcript and suggest a possible general mechanism for BCR-ABL breakpoints. *Haematologica.* 2000; 85: 40–6.
30. How G., Lim L., Kulkarni S. et al. Two patients with novel BCR/ABL fusion transcripts (e8/a2 and e13/a2) resulting from translocation breakpoints within BCR exons. *Br. J. Haematol.* 1999; 105: 434–6.
31. Qin Y.Z., Jiang B., Jiang Q. et al. Imatinib mesylate resistance in a chronic myeloid leukemia patient with a novel e8a2 BCR-ABL transcript variant. *Acta Haematol.* 2008; 120: 146–9.
32. Park I.J., Lim Y.A., Lee W.G. et al. A case of chronic myelogenous leukemia with e8a2 fusion transcript. *Cancer Gen. Cytogen.* 2008; 185: 106–8.
33. Burmeister T., Reinhardt R. A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR-ABL fusion transcripts. *Leuk. Res.* 2008; 32: 579–85.
34. Дубина М.В., Кувва Д.А., Хомякова Т.Е. и др. Молекулярный мониторинг эффективности терапии больных хроническим миелолейкозом в России (по материалам Всероссийской научно-практической конференции, Иркутск, 3–4 сентября 2010 г.). *Современная онкология.* 2010; 4: 9–15. [Dubina M.V., Kuevda D.A., Khomyakova T.E. et al. Molecular monitoring of the treatment efficacy in patients with chronic myeloid leukemia in Russia (Materials of Russian Theoretical and Practical Conference, Irkutsk, September 3–4, 2010). *Sovremennaya onkologiya.* 2010; 4: 9–15. (In Russ.)]
35. Hughes T., Deininger M., Hochhaus A. et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors — review and recommendations for 'harmonizing' current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood.* 2006; 108: 28–37.
36. Schliben S., Borkhardt A., Reinisch J. et al. Incidence and clinical outcome of children with BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). A prospective RT-PCR study based on 673 patients enrolled in the German pediatric multicenter therapy trials ALL-FM-90 and CoALL-05-92. *Leukemia.* 1996; 10: 957–63.

