

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.419-018.46-006:577.21.083

Горбенко А.С.<sup>2,3</sup>, Столяр М.А.<sup>2,3</sup>, Ольховский И.А.<sup>2,3</sup>, Абдуллаев А.О.<sup>1</sup>, Судариков А.Б.<sup>1</sup>, Дунаева Е.А.<sup>4</sup>, Миронов К.О.<sup>4</sup>, Шипулин Г.А.<sup>4</sup>

### АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ В АЛГОРИТМЕ ВЫЯВЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ КАЛЬРЕТИКУЛИНА (CALR)

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 125167, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 660036, Красноярск, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный Центр Сибирского отделения РАН», 660036, Красноярск, Россия;

<sup>4</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия

*Выявление соматических мутаций в гене CALR регламентировано клиническими рекомендациями для диагностики эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза. Выявление мутаций CALR обычно проводят трудоёмкими методами, требующими специальных навыков работы и дорогостоящего оборудования.*

*Цель работы – сравнение результатов выявления мутаций гена CALR в пробах венозной крови методами аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с последующим электрофорезом, фрагментным анализом и секвенированием по Сэнгеру и методом пиросеквенирования.*

*Исследованы 1284 образца крови пациентов с подозрением на хронические миелопролиферативные новообразования и 20 образцов крови доноров. Мутации в гене CALR I и II типа определяли с помощью аллель-специфической ПЦР-РВ, используя оригинальные праймеры и TaqMan-зонды. Редкие варианты мутаций CALR определяли с помощью электрофоретической детекции. Все положительные образцы были в дальнейшем исследованы методами фрагментного анализа и секвенирования по Сэнгеру, а также разработанным методом пиросеквенирования с использованием прибора PyroMarkQ24.*

*Использование аллель-специфической ПЦР с последующей электрофоретической детекцией позволило определить наличие клинически значимых мутаций в гене CALR в 81 образце венозной крови JAK2- и MPL-негативных пациентов, в том числе 42 случая мутации I типа, 33 – II типа и 8 редких мутаций CALR. Ни в одном из 20 образцов доноров крови и 121 образце крови пациентов с истинной полицитемией мутаций в 9-ом экзоне CALR не было выявлено. В 20 отрицательных образцах мутации CALR также не были обнаружены и при использовании секвенирования по Сэнгеру. Все положительные образцы подтверждены фрагментным анализом и секвенированием.*

*Описанный сочетанный подход выявления мутаций гена CALR в образцах периферической крови может использоваться в лабораториях, имеющих стандартный комплект оборудования для ПЦР-РВ и электрофореза нуклеиновых кислот. В качестве подтверждающего теста предложен метод пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа PyroMarkQ24.*

**Ключевые слова:** хронические миелопролиферативные неоплазии; аллель-специфическая ПЦР; соматические мутации CALR.

**Для цитирования:** Горбенко А.С., Столяр М.А., Ольховский И.А., Абдуллаев А.О., Судариков А.Б., Дунаева Е.А., Миронов К.О., Шипулин Г.А. Аллель-специфическая полимеразная цепная реакция и электрофоретическая детекция в алгоритме выявления клинически значимых соматических мутаций в гене кальретикулина (calr). Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (8): 588-592. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-588-592>

Горбенко А.С.<sup>2</sup>, Столяр М.А.<sup>2,3</sup>, Olkhovskiy I.A.<sup>2,3</sup>, Abdullaev A.O.<sup>1</sup>, Sudarikov A.B.<sup>1</sup>, Dunaeva E.A.<sup>4</sup>, Mironov K.O.<sup>4</sup>, Shipulin G.A.<sup>4</sup>

ALLELE-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION AND ELECTROPHORETIC DETECTION IN THE DETECTION ALGORITHM CLINICALLY SIGNIFICANT SOMATIC MUTATIONS IN THE GENE OF CALRETI-CULIN (CALR)

<sup>1</sup> National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup> Krasnoyarsk branch of the "National Research Center for Hematology", 660036, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>3</sup> Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", 660036, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>4</sup> Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia

*The detection of somatic mutations in the 9 exon of the calreticulin gene (CALR) is regulated by the clinical recommendations as a diagnostic criterion for chronic Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN). Some methods of nucleic acids testing are used to identify CALR gene mutations with different requirements for special skills of personnel and expensive equipment. The purpose of this work is to compare the results of the detection of CALR gene mutations in venous blood samples by allele-specific RT-PCR with subsequent electrophoresis, fragment analysis and Sanger- or pyro-sequencing. We used 1284 blood samples of patients with*

*suspected MPN and 20 blood donor samples. Mutations in the CALR gene of the I and II type were identified using PCR-RT with the original primers and TaqMan probes. Also, all samples were tested for mutations in the CALR gene by electrophoretic detection of PCR results in an agarose gel. The use of allele-specific RT-PCR followed by electrophoretic detection made it possible to determine clinically significant mutations in the CALR gene in 81 venous blood samples of JAK2- and MPL-negative patients, including 42 cases of type I mutation, 33 cases of type II mutation and 8 rare CALR mutations. Mutations in the 9 exon of the CALR gene were not detected in any of the 20 blood donor samples or in 121 blood samples of patients with polycythemia vera. In randomly selected 20 negative samples, CALR gene mutations were also not detected using Sanger sequencing. All positive samples were confirmed by fragment analysis, as well as with Sanger-sequencing and pyro-sequencing. The described combined approach to detect mutations of the CALR gene in peripheral blood samples can be used in clinical diagnostic laboratories that have a standard set of equipment for electrophoresis of nucleic acids and a PCR-RT. We also propose a confirmatory test based on the pyrosequencing of DNA using the system of genetic analysis "PyroMark Q24".*

**Key words:** chronic myeloproliferative neoplasms; allele-specific RT-PCR; somatic mutations CALR.

**For citation:** Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Olkhovskiy I.A., Abdullaev A.O., Sudarikov A.B., Dunaeva E.A., Mironov K.O., Shipulin G.A. ALLELE-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION AND ELECTROPHORETIC DETECTION IN THE DETECTION ALGORITHM CLINICALLY SIGNIFICANT SOMATIC MUTATIONS IN THE GENE OF CALRETICULIN (CALR). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (8): 588-592 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-588-592>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 10.04.2018  
Accepted 11.05.2018

**Введение.** Хронические Ph-негативные миелопролиферативные новообразования (ХМН) характеризуются неконтролируемой избыточной продукцией клеток миелоидного ряда, развитием воспалительного процесса в костном мозге с последующей трансформацией в острый лейкоз и прогрессией миелофиброза [1]. Накопление в периферической крови всех трёх ростков миелоидного кроветворения определяет клиническую картину истинной полицитемии (ИП), преобладание мегакариоцитарного ростка характеризует эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ), а первичное преобладание выраженных склеротических процессов приводит к первичному миелофиброзу (ПМФ).

В отличие от классического варианта хронического миелолейкоза (ХМЛ) при ХМН в трансформированных клетках отсутствуют Ph-хромосома и химерный транскрипт BCR-ABL. Уже более 10 лет назад были идентифицированы характерные для ХМН соматические мутации в генах янускиназы-2 (JAK2) и рецептора тромбопоэтина (MPL). Вместе с тем примерно в 40% случаев клинически выраженной картины ЭТ и ПМФ эти мутации не обнаруживаются. Только в конце 2013 г. две независимые научные группы [2,3] опубликовали данные о важной патогенетической роли при этих заболеваниях соматических мутаций в 9-ом экзоне гена кальретикулина (CALR), обнаруживаемые у 60% среди тех пациентов с ЭТ и ПМФ, которые не имеют мутаций в генах JAK2 и MPL; при этом мутации CALR не выявляются при ИП. С 2016 г. тест на выявление мутаций CALR был включён в рекомендации ВОЗ [4] и в российские клинические рекомендации [5] в качестве одного из основных критериев дифференциальной диагностики ХМН и подтверждения ЭТ и ПМФ.

CALR является Ca<sup>2+</sup>-связывающим белком, преимущественно локализованным в эндоплазматическом ретикулуме с универсальными функциями. Как шаперон, он участвует в фолдинге и контроле синтеза гликопротеинов, вовлечен в регуляцию Ca<sup>2+</sup>-зависимых сигнальных процессов, в том числе апоптоз клеток, их миграцию, адгезию и множество других клеточных функций [6].

Клинически значимые для ХМН мутации в гене CALR вызывают сдвиг рамки считывания и обрыв терминального С-участка синтезируемой пептидной цепочки. В результате у образующегося белка отсутствует аминокислотная последовательность «возврата-задержки» Lys-Asp-Glu-Leu, ответственная за удержание кальретикулина в эндоплазматическом ретикулуме. Показано, что в таком «укороченном» варианте кальретикулин способен выступать в качестве «нефизиологического» стимулятора рецепторов тромбопоэтина

[7], тем самым провоцируя гиперактивацию сигнального пути MPL-JAK2-STAT и вызывая избыточную пролиферацию мегакариобластов.

Наиболее часто в 9-ом экзоне CALR встречаются мутация I типа: делеция с.1092\_1143del52bp – 53–65%, и II типа: инсерция с.1154\_1155insTTGTGTC – 32%, в остальных 3–15% случаев определяются редкие типы мутаций [2, 3, 8]. В связи с тем, что делеции в отличие от инсерций сопровождаются утратой существенной части Ca<sup>2+</sup>-связывающей области белка, I тип мутаций характеризуется также и снижением мобилизации цитоплазматического Ca<sup>2+</sup> в ответ на активационные стимулы [6].

Пациенты с мутациями в гене CALR – это преимущественно мужчины, отличаются ранним началом заболевания, имеют более высокие значения тромбоцитоза, но при этом меньший риск развития серьёзных тромботических и геморрагических осложнений [9, 10]. Ряд авторов предлагают объединить таких пациентов в отдельную клиническую группу с более благоприятным прогнозом и ответом на терапию интерфероном [11].

Большинство лабораторий для выявления мутаций в 9-ом экзоне CALR в пробах венозной крови используют классическую ПЦР с последующим фрагментным анализом или секвенированием по Сэнгеру [12]. Предложены также методы детекции, основанные на анализе кривых плавления ДНК высокого разрешения [13]. В практике клинико-диагностических лабораторий используется также метод пиросеквенирования [13]. Вместе с тем данные методы не лишены недостатков, они достаточно трудоёмкие и требуют использования дорогостоящего оборудования. Их существенным недостатком также является ограниченный предел аналитической чувствительности (10–20%). Единственный известный более чувствительный (0,08–0,6%) коммерческий набор Ipsogen® CALR RGQ PCR Kit для выполнения аллель-специфической ПЦР-РВ [14] валидирован только для одного прибора – Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Qiagen cat. no. 9002032) и двух наборов тех же производителей для выделения ДНК. Кроме того, набор не имеет на сегодняшний день официального разрешения для клинического использования в качестве медицинского изделия. Ранее отдельными авторами настоящей работы был разработан метод аллель-специфической ПЦР для выявления мутаций в гене CALR [15] и продемонстрированы его диагностические возможности [16].

Цель работы – сравнение результатов выявления мутаций гена CALR методами аллель-специфической ПЦР-РВ с по-

следующим электрофорезом, фрагментным анализом и секвенированием.

**Материал и методы.** В настоящей работе тестировали образцы крови 1284 пациентов, поступивших для проведения молекулярно-генетических исследований при подозрении на ХМН, а также пациентов с установленным диагнозом, с целью мониторинга за трансформированным клоном клеток. Все поступившие образцы венозной крови пациентов тестировались в параллельном алгоритме на все основные драйверные мутации ХМН как описано ранее [17]. Взятие крови производили в вакутейнеры с К2-ЭДТА. Для выделения ДНК из лейкоцитов цельной крови использовали набор реагентов «Нуклео-Экстра» («Формула гена», Красноярск). Наличие мутаций I и II типа в гене CALR определяли методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием зондов TaqMan на приборах IQ5 или CFX96 (Bio-Rad, США).

**Алель-специфическая ПЦР-РВ с электрофетической детекцией продуктов амплификации.** Подбор праймеров при разработке метода ПЦР-РВ был выполнен с помощью программного продукта Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, США). Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 1X ПЦР-буфер, 0,25 mM MgCl<sub>2</sub> (ООО «Формула гена», Красноярск), 0,25 mM dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы («Синтол», Москва), 200 нМ каждого праймера и зонда. Использовали следующие праймеры:

Прямой праймер на дикий тип – 5'-ТААСAAAGGTG-AGGCCTGGT-3'

Прямой праймер на мутацию I типа – 5'-AAACAGGAC-GAGGAGCAGAGGA-3'

Прямой праймер на мутацию II типа – 5'-GAGGAGGCA-GAGGACAATTG-3'

Обратный праймер (общий) – 5'-GCCTCTCTACAGCTCG-TCCCTT-3'

TaqMan-зонд – FAM-TGAGGATGAGGAGGATGAGG-VHQ1

В реакцию добавляли 20–100 нг геномной ДНК.

Продукты амплификации для определения более редких типов мутаций CALR после выполнения анализа в режиме реального времени разделяли в 3% агарозном геле в триацетатном буфере. Гель документировали после окрашивания бромистым этидием. В качестве маркера молекулярной массы использовали реагент O'GeneRuler® с маркерами мол. масс 25–700 длины фрагментов (Thermo Scientific). Для определения чувствительности и линейности метода использовали сконструированную плазмиду на основе вектора pAL2-TA. Линейность и чувствительность метода оценивали по пороговым циклам (Cq) графиков накопления флуоресцентного сигнала в серии 10-кратных разведений плазмиды.

**Фрагментный анализ участка 9-го экзона гена CALR.**

Для амплификации участка 9-го экзона гена CALR использовали пару праймеров: 5'-CTGAGGTGTGTGCTCTGCC3' и 5'-FAMCAGAGACATGATTTGGCGCGG 3'. Длина фрагмента участка 9-го экзона гена CALR, соответствующая дикому типу, составляла 301 п.н.

**Секвенирование ДНК.** Подбор праймеров при разработке метода был выполнен с помощью программного продукта PSQ Assay Desig (Qiagen, Германия). Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала dNTP (0,88 mM), 0,5 мкл реактива «Полимераза TaqF», 10 мкл реактива «2,5x ПЦР-буфера blue» и 280 нМ каждого праймера. Все реагенты были произведены ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии

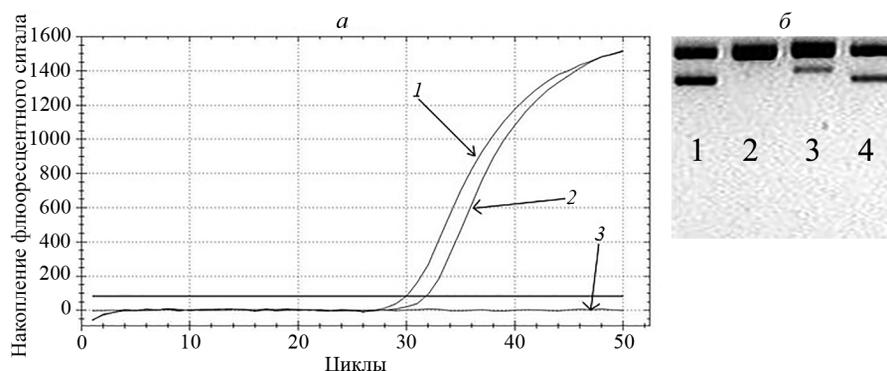


Рис. 1. Примеры результатов ПЦР-РВ и электрофореза в пробах с различными типами мутаций в гене CALR.

*а* - график накопления флуоресцентного сигнала в ходе ПЦР-РВ: 1-проба с мутацией CALR I типа; 2-проба с мутацией CALR II типа; 3-проба без мутаций CALR или с мутацией редко встречающегося типа; *б* - электрофореграмма: 1-проба с мутацией CALR I типа; 2-проба без мутаций CALR; 3-проба с мутацией CALR II типа; 4-проба с мутацией редко встречающегося типа.

Роспотребнадзора («АмплиСенс®», Россия). Использовали следующие праймеры:

Прямой праймер – 5'-Biotin-GCAGCAGAGAAACAATGAAGGACAAAAC-3'

Обратный праймер – 5'-AGGCAGGCCTCTCTACAGCTCGT-3'

В реакцию добавляли 20–100 нг геномной ДНК.

Амплификацию проводили на амплификаторе Maxyge (Axugen, США) по программе: 95°C – 15 мин; 95°C – 15 с, 60°C – 15 с, 72°C – 20 с (45 циклов).

Проведение секвенирования по Сэнгеру проводили с использованием реагентов фирмы Applied Biosystems (США) и генетического анализатора 3500xL (Applied Biosystems, США) с теми же праймерами. Все действия (пробоподготовка продуктов ПЦР, секвенирующая амплификация и капиллярный электрофорез) проведены согласно инструкции изготовителя.

Определение нуклеотидных последовательностей с использованием технологии пиросеквенирования проведено с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24 согласно рекомендациям производителя (Qiagen, Германия). Для пиросеквенирования использовали 7 мкл продукта амплификации, пробоподготовку проводили с использованием набора реактивов «Пироскрин» («АмплиСенс®», Россия) [13]. Реакционная смесь для пиросеквенирования (25 мкл) содержала следующие праймеры в концентрации 300 нМ:

праймер на мутацию I типа – 5'-CATCATCCTCC-TTGTCCCTCT-3'

праймер на мутацию II типа – 5'-TCTTTGTCCTCA-TCATCCTC-3'.

Секвенируемые участки имели следующие последовательности:

GC[CTCCTCCTCCTCTTTGCG TTTCTTGTCTTCTTCTCCTCCTCCTTAAGCCTCTG C]TCCTCGTCTGTTTGTCTTCAATT (для анализа

мутации c.1092\_1143del52bp) и C[GACAA] TTGTCTCTGCCTCCTCCTCTT (для анализа мутации

c.1154\_1155insTTGTCT). Обработку результатов проводили в количественном формате с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 (Qiagen, Германия).

Все образцы с мутациями, отличающимися от I и II типа, давали искажение сигнала при пиросеквенировании в консервативных и полиморфных областях, в связи с чем они были повторно секвенированы на приборе PyroMark Q24 в формате *de novo* (последовательное добавление по очереди нуклеотидов: Nx[AGTC]) и методом Сэнгера в качестве подтверждающего золотого стандарта.

**Результаты.** На рис. 1 представлены результаты определения мутантных вариантов гена CALR I и II типа в ПЦР-

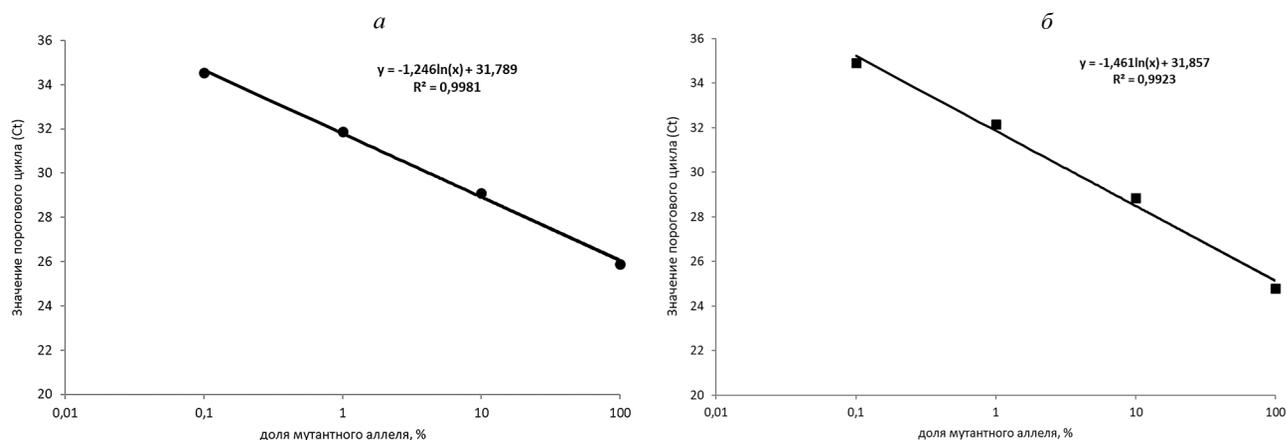


Рис. 2. Стандартная кривая, полученная после проведения ПЦР-РВ в пробах плазмид с разными концентрациями мутантного аллеля: а – мутация CALR I типа; б – мутация CALR II типа.

РВ и пример выявления нестандартной мутации CALR при электрофоретической детекции.

Результаты детекции стандартных разведений плазмидной ДНК с характерными для мутантных вариантов гена CALR I и II типа последовательностями представлены на рис. 2. Данные демонстрируют чёткую линейную зависимость величины порогового цикла от внесённой концентрации плазмиды. При этом максимальный 35-й цикл соответствует минимально детектируемой концентрации 0,1% плазмидной ДНК, разведённой в ДНК, содержащей неизменённый ген CALR.

Стандартное отклонение величины пороговых циклов при проведении 20 последовательных тестов с использованием стандарта плазмид с концентрацией мутантного аллеля 10% составило 0,49 для мутантного аллеля CALR I и II типа. При дублированном тестировании проб пациента в разных аналитических сериях стандартное отклонение составляло не более 0,3. Из 20 проб здоровых доноров крови при тестировании использованным методом не было выявлено ни одного случая ложноположительного результата.

В табл. 1 представлены итоговые результаты тестирования проб венозной крови пациентов, направленных врачами-гематологами в лабораторию с подозрением на ХМН в период с 2012 по 2016 г. Среди обследованных пациентов у большей части (75%) диагноз онкогематологического заболевания в последующем не подтвердился. Использование параллельного алгоритма тестирования позволило выявить мутации в гене CALR у 48% пациентов с ЭТ и у 61% пациентов с МФ. Доля выявляемых мутаций CALR I и II типа составили 49 и

42%, нестандартные мутации составили 8% от всех выявленных мутаций 9-го экзона CALR. Нами не было обнаружено ни одного случая данной мутации у пациентов с ИП или при вторичных неклональных гематологических нарушениях.

В отобранных случайным образом 20 отрицательных пробах при секвенировании по Сэнгеру было определено наличие только интактного участка 9-го экзона CALR. Все пробы с положительными результатами выявления мутаций CALR в дальнейшем были верифицированы альтернативными методами детекции.

Результаты независимо проведённого для части образцов фрагментарного анализа (табл. 2) совпали с результатами ПЦР-РВ полностью в 13 пробах по II типу мутации и в 28 из 31 случая выявления мутации I типа. В трёх discordantных случаях в результате фрагментного анализа пробы были определены как содержащие нестандартные мутации:

Таблица 2

Сравнение результатов определения мутаций CALR методом ПЦР-РВ с последующим электрофорезом с результатами детекции методом фрагментного анализа

Типы мутаций CALR	ПЦР-РВ +электрофорез	Фрагментный анализ
CALR I тип с.1092_1143del	31	28
CALR II тип с.1154_1155insTTGTC	13	13
Редкие мутации CALR	6	9
Всего	50	50

Таблица 3

Сравнение результатов определения мутаций CALR методом ПЦР-РВ с последующим электрофорезом с результатами пиросеквенирования

Типы мутаций CALR	ПЦР-РВ +электрофорез	Пиросеквенирование
CALR I тип с.1092_1143del	39	37
CALR II тип с.1154_1155insTTGTC	36	35
Редкие мутации CALR	5	7 (1)*
Всего	80	79

Примечание. \* - одна проба с нестандартной мутацией, определённой при электрофорезе и в результате фрагментного анализа (делеция 65 нуклеотидов) имела сомнительный результат при пиросеквенировании. Её не удалось идентифицировать при секвенировании в связи с недостаточной аллельной нагрузкой в анализируемом образце.

Таблица 1

Результаты определения мутаций в гене CALR у обследованных пациентов методом ПЦР-РВ с последующей электрофоретической детекцией

Типы мутаций CALR	Всего	ИП	ЭТ	МФ	Неподтвержденный диагноз ХМН, вторичные эритроцитозы
Без мутаций CALR	1193	121*	81**	11**	959
CALR I тип с.1092_1143del	45	0	38	7	0
CALR II тип с.1154_1155insTTGTC	39	0	30	9	0
Редкие мутации CALR	8	0	6	2	0

Примечание. \* – пробы, позитивные в тестах выявления мутации в гене JAK2; \*\* – пробы, позитивные в тестах выявления мутации в генах JAK2 или MPL.

две пробы с делецией 50 нуклеотидов и одна с делецией 46 нуклеотидов. При этом все 6 нестандартных мутаций, выявленных в результате электрофоретической детекции, совпали с данными фрагментного анализа.

Использование метода пиросеквенирования при независимом исследовании 80 образцов (табл. 3) продемонстрировало высокий уровень совпадения результатов выявления мутаций CALR I и II типа. Две мутации, определённые в ПЦР-РВ как делеции I типа, при пиросеквенировании и последующем секвенировании по Сэнгеру оказались редко встречающимися мутациями гена CALR – с.1105\_с.1142 del38bp и с.1094\_с.1139 del46bp. Одна из мутаций CALR II типа при секвенировании по Сэнгеру и при пиросеквенировании была идентифицирована как редкий вариант: с.1154\_с.1155 insGTGTC.

**Обсуждение.** Сравнение методов тестирования образцов венозной крови пациентов с ЭТ и МФ продемонстрировало полное совпадение факта выявления клинически значимых мутаций в 9-ом экзоне гена CALR, при этом в 95% случаев определяется совпадение также и по типу мутаций. Выявляемые дискордантные результаты относятся только к вопросам дифференцировки мутации II типа с редко встречающимися типами делеций в гене CALR, мутации I типа с редко встречающимися типами инсерций в гене CALR. Ни в одном из случаев расхождения результатов не было выявлено вариантов несовпадения между мутациями I и II типа. Поэтому результаты тестирования крови с использованием любого из представленных молекулярно-генетических методов будут иметь одинаковое клиническое значение. Большая доступность и сравнительная простота использования методов ПЦР-РВ и электрофореза позволяют рекомендовать разработанный метод к использованию в клинико-диагностических лабораториях. Отсутствие ложноположительных результатов при тестировании доноров и пациентов с ИП свидетельствует о достаточно высокой специфичности описанного метода ПЦР-РВ. Кроме того, более высокая чувствительность аллель-специфической ПЦР-РВ позволяет выявлять мутации при более низких значениях аллельной нагрузки, хотя данный метод пока не может быть рекомендован как количественный тест, поскольку для этого требуются дополнительные доказательства.

Вместе с тем в случае, если предел чувствительности теста менее 1% мутантного варианта ДНК, возникает опасность неправильной интерпретации результата клиницистами, поскольку минимальные пулы циркулирующих клональных клеток могут не оказывать влияния на проявление клинических симптомов или прогноз заболевания. В этом случае применение менее чувствительных методов, определяющих не менее 10% аллельной нагрузки, будет более предпочтительным для клинического использования. Более того, для выделения и сравнения клинической картины заболевания в группах пациентов с редкими типами мутаций методы секвенирования однозначно не имеют конкуренции в специфичности определения идентифицируемых мутаций.

**Заключение.** Таким образом, в настоящем исследовании продемонстрирована возможность использования для выявления мутаций в гене CALR метода аллель-специфической ПЦР-РВ с последующим электрофоретическим разделением продуктов реакции. Результаты предложенного алгоритма тестирования полностью совпадают по своей клинической значимости с результатами фрагментного анализа и пиросеквенирования. Разработанный метод может быть рекомендован для использования в алгоритме диагностики ХМН.

**Благодарности.** Авторы выражают признательность врачам-гематологам КГБУЗ “Красноярская краевая клиническая больница” Е.В. Васильеву, М.Г. Смелянской и врачам-гематологам КГБУЗ “Городская клиническая больница № 7” М.А. Михалёву и Т.И. Ольховик за участие в подборе проб крови пациентов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-4, 6-12 см. REFERENCES)

1. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич В.С. Миелолипролиферативные новообразования. М.: Литтерра; 2016.
5. Меликян А.Л., Туркина А.Г., Ковригина А.М., Суборцева И.Н., Судариков А.Б., Соколова М.А. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелолипролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) (ред. 2016 г.). *Гематология и трансфузиология*. 2017; 62(S1): 25-60.
13. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шипулин Г.А. Опыт использования систем генетического анализа на основе технологии пиросеквенирования. *Справочник заведующего КДЛ*. 2016; 5: 33-42.
14. Доступно по: <https://www.qiagen.com/no/shop/new-products/real-time-pcr/ipsogen-calr-rqg-pcr-kit-ce/#resources> Ссылка активна на 20.03.2018.
15. Горбенко А.С., Столяр М.А., Ольховский И.А. Разработка молекулярно-генетического теста выявления мутаций в гене кальретикулина (CALR). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(9):29.
16. Ольховский И.А., Горбенко А.С., Столяр М.А., Субботина Т.Н., Васильев Е.В., Виноградова Е.Ю. и др. Определение мутации в гене кальретикулина у пациентов с подозрением на хронические миелолипролиферативные неоплазии. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59(3): 12-5.
17. Ольховский И.А., Горбенко А.С., Субботина Т.Н., Столяр М.А. Современные возможности молекулярно-генетического анализа в диагностике хронических миелоидных опухолей. *Медицинский алфавит. Современная лаборатория*. 2015;4(18):44-6.

## REFERENCES

1. Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich V.S. *Myeloproliferative neoplasms [Mieloproliferativnyye novoobrazovaniya]*. Moscow: Litterra; 2016. (in Russian)
2. Klampf T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S., Nivarthi H., Rumi E., Milosevic J.D., et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(25): 2379-90.
3. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J., Nice F.L., Gundem G., Wedge D.C., et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(25): 2391-405.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20): 2391-405.
5. Melikyan A.L., Turkina A.G., Kovrigina A.M., Subortseva I.N., Sudarikov A.B., Sokolova M.A. et al. Clinical recommendations for diagnosis and therapy of Ph-negative myeloproliferative neoplasms (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis) (edition 2016). *Gematologiya i transfuziologiya*. 2017; 62(S1): 25-60. (in Russian)
6. Shivarov V., Ivanova M., Tiu R.V. Mutated calreticulin retains structurally disordered C terminus that cannot bind Ca<sup>2+</sup>: some mechanistic and therapeutic implications. *Blood Cancer J.* 2014; 4(2): e185.
7. Stanley R.F., Steidl U. Molecular Mechanism of Mutant CALR-Mediated Transformation. *Cancer Discov.* 2016; 6(4): 344-6.
8. Imai M., Araki M., Komatsu N. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Int. J. Hematol.* 2017; 105(6): 743-7.
9. Rotunno G., Mannarelli C., Guglielmelli P., Pacilli A., Pancrazzi A., Pieri L. et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*. 2014; 123(10): 1552-5.
10. Rumi E., Pietra D., Ferretti V., Klampf T., Harutyunyan A.S., Milosevic J.D. et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014; 123(10):1544-51.
11. Cassinat B., Verger E., Kiladjian J.J. Interferon alfa therapy in CALR-mutated essential thrombocythemia. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371: 188-9.
12. Gardner J.A., Peterson J.D., Turner S.A., Soares B.L., Lancor C.R., Dos Santos L.L. et al. Detection of CALR Mutation in Clonal and Nonclonal Hematologic Diseases Using Fragment Analysis and Next-Generation Sequencing. *Am. J. Clin. Pathol.* 2016; 146(4): 448-55.
13. Mironov K.O., Dunayeva Ye.A., Dribnokhodova O.P., Shipulin G.A. Experience in using genetic analysis systems based on pyrosequencing technology. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2016; 5: 33-42. (in Russian)
14. Qiagen. Available at: <https://www.qiagen.com/no/shop/new-products/real-time-pcr/ipsogen-calr-rqg-pcr-kit-ce/#resources> (accessed 20 March 2018).
15. Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Olkhovskiy I.A. Development of a molecular genetic test for the detection of mutations in the calreticulin gene (CALR). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(9): 29. (in Russian)
16. Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Subbotina T.N., Vasiliev E.V., Vinogradova E.Yu. et al. Identification of mutation in calreticulin gene in patients with suspicion on chronic myeloproliferative diseases. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2014; 3(59): 12-5. (in Russian)
17. Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Subbotina T.N., Vasiliev E.V., Vinogradova E.Yu. et al. Modern possibilities of molecular-genetic analysis in diagnosis of chronic myeloid tumors. *Meditsinskiy alfavit*. 2015; 4(18): 44-6. (in Russian)

Поступила 19.04.18

Принята к печати 11.05.18