

флюоресцентный зонд и обратный праймер для выявления каждого полиморфизма. 3'-конец одного из каждой пары прямых праймеров соответствовал нуклеотиду нормальной последовательности ДНК исследуемого гена, а другой соответствовал нуклеотиду мутантной последовательности. Для идентификации мутаций в функциональном гене *GVA* и исключения выявления мутаций в псевдогене подбирали обратный праймер, полностью гомологичный участку последовательности функционального гена и имеющий различия на 3'-конец с соответствующим участком псевдогена. Амплификация псевдогена в таком случае была исключена. Все олигонуклеотиды были синтезированы для проведения мультиплексной ПЦР-РВ в формате Taqman.

Результаты и обсуждение. Разработаны тест-системы для специфичного и быстрого выявления указанных полиморфизмов. Каждая из тест-систем предусматривает параллельное проведение двух мультиплексных ПЦР-РВ: первая –

с нормальными праймерами, вторая – с мутантными. При появлении соответствующего ПЦР-продукта только в первой реакции образец классифицируют как "без мутаций", при появлении ПЦР-продукта только во второй реакции – как "гомозигота по мутации", в обеих реакциях – как "гетерозигота по мутации".

Заключение. Тест-системы для выявления наиболее часто встречаемых мутаций, вызывающих наследственный гемохроматоз, болезни Вильсона–Коновалова и Гоше апробированы в ФГБУ Гематологический научный центр (Москва) и являются незаменимым инструментом для выявления и верификации диагнозов этих болезней. Кроме того, мы полагаем, что применение метода аллель-специфической ПЦР-РВ для обнаружения заведомо известных точечных мутаций, делеций и инсерций является высокоспецифичной, быстрой и недорогой заменой секвенированию и другим методам исследования мутаций.

Определение ПНГ-клона у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии

Фидарова З.Т.¹, Михайлова Е.А.¹, Гальцева И.В.¹, Устинова Е.Н.¹, Троицкая В.В.¹, Луговская С.А.², Наумова Е.В.², Почтарь М.Е.², Паровичникова Е.Н.¹, Савченко В.Г.¹

¹ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, Москва; ²Кафедра клинической лабораторной диагностики ГОУ ДПО РМАПО, Москва

Введение. Современная иммуносупрессивная терапия (ИСТ) значительно повышает эффективность лечения больных апластической анемией (АА), но 20–30% больных остаются рефрактерными к проводимой терапии. По данным международных исследований выявление ПНГ-клона при АА может расцениваться как фактор, предопределяющий хороший ответ на ИСТ.

Цель работы. Выявление и мониторинг ПНГ-клона у больных АА и определение его значения для оценки эффективности ИСТ.

Материалы и методы. В исследование включены 38 больных *de novo* АА в период с 05.2011 по 11.2013 г., медиана наблюдения 12 мес, медиана возраста 26 лет. Больных разделили на группы: 1-я группа – с наличием ПНГ-клона, 2-я группа – с отсутствием ПНГ-клона. Всем проводили ИСТ (АТГ и ЦА). Ответ на лечение оценивали как гематологическое улучшение – ГУ [Hb > 80 г/л, Гр > 1,0 (для ТАА > 0,5), Тр > 30]. ПНГ-клон определяли методом проточной цитометрии. Минорный клон менее 1%.

Результаты. До начала ИСТ ПНГ-клон выявлен у 55,2% больных: медиана эр. – 0,1%, гр. – 0,76%, мон. – 5%. К 3 мес лечения ГУ достигнуто у 47,4% больных, из которых 77,8% из 1-й группы и только 22,2% из 2-й группы. Среди больных, у которых не достигнуто ГУ к 3-му месяцу терапии (52,6%), соответственно преобладали больные из 2-й группы (65%), а у больных 1-й группы (35%) отличие было только по большему значению ПНГ-клона на моноцитах – 5,8% против 0,7% у ответивших на лечение. На момент анализа ГУ получено у 73,7% больных: в 1-й группе – у 47,4%, во 2-й группе – у 26,3%. У 6 больных 2-й группы отмечались появление и персистенция ПНГ-клона. Среди больных 1-й группы с ГУ у 1 больного наблюдалось исчезновение клона, а у 3 – увеличение клона и появление клинически выраженного внутрисосудистого гемолиза.

Заключение. Положительный ответ чаще достигался в группе больных с изначально выявленным ПНГ-клоном. Появление и персистенция ПНГ-клона у 6 больных после проведения ИСТ наблюдались при положительном ответе на терапию, что указывает на связь ответа на ИСТ с присутствием ПНГ-клеток.

Текстурный анализ морфологических особенностей лейкоцитов при заболевании лейкозом

Фурман О.Г., Глушен С.В.

Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова; Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение. Актуальность проблемы своевременной диагностики лейкозов обусловлена высокой степенью распространенности этой группы заболеваний. Современные методы терапии позволяют излечивать таких больных, которые еще в недавнем прошлом считались безнадежными. Однако жизнь пациента во многом зависит от того, как скоро начато лечение, поэтому своевременная постановка диагноза приобретает особое значение. Применение методов диагностики, отличающихся повышенной точностью, объективностью и высокой скоростью получения результатов, на первом этапе обследования позволило бы существенно упростить задачу выявления и дифференциальной диагностики лейкозов.

Цель работы. Изучить перспективность компьютерного анализа цитологических препаратов периферической крови больных с различными формами лейкозов с помощью текстурных параметров для дифференцировки заболеваний кроветворной системы на основе различий в фенотипах лейкоцитов.

Материалы и методы. Для изучения фенотипических особенностей лейкоцитов периферической крови была разработана методика количественной оценки их морфологии после окрашивания их флюорохромом Rhodamin В. Данная методика, реализованная с помощью флюоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 50i (объектив Nikon 60x/0.80) и камеры Nikon DS-5M (цифровую съемку проводили программой Nis-elements F 3.0), позволила измерить текстурные параметры изображений клеток. Компьютерную обработку изображений производили с помощью программы CellProfiler (CellProfiler.com). Фенотипы лейкоцитов регистрировали по 13 параметрам: Angular Second Moment, Contrast, Correlation, Variance, Sum Variance, Difference Variance, Inverse Difference Moment (IDM), Sum Average, Entropy, Sum Entropy, Difference Entropy, Information Measure of Correlation 1, Information Measure of Correlation 2. Для обработки результатов использовали метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).