

Диагностика хронических лейкозов с применением методов молекулярной цитогенетики. Особенности методологии

Возилова А.В.

ФГБУН Уральский Научно-Практический Центр Радиационной Медицины, г. Челябинск, e-mail: vozilova@urcrm.ru

Цитогенетические методы исследования клеток костного мозга и периферической крови у лиц с онкогематологическими диагнозами широко используются для диагностики заболеваний и оценки их степени тяжести. Разнообразие методов окраски хромосом позволяет наиболее полно оценить генетические аномалии, что важно для определения тактики лечения и прогноза течения заболеваний. Поскольку лаборатории часто ограничены в финансовых средствах, важно выработать подходы для выбора цитогенетического метода анализа. Цель настоящей работы заключалась в анализе цитогенетической патологии в клетках костного мозга у лиц с хроническими формами лейкозов с применением трех методов окраски, что позволило сформировать методологию цитогенетического исследования для разных групп заболеваний (хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз, множественная миелома, первичный миелофиброз). В работе были использованы: дифференциальное GTG-окрашивание, 24-цветный FISH. У лиц с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) препараты окрашивались с использованием локуспецифичных зондов: ATM(11q22)/TP53(17p13) и DLEU(13q14)/LAMP(13q34)/cen12(12p11.1;12q11.1). Результаты исследования позволили заключить: дифференциальное окрашивание позволяет выявить все структурные перестройки хромосом, но только при идеальном качестве препарата, что при работе с костным мозгом бывает не часто. Использование 24-цветного FISH позволяет выявить транслокации, даже если качество хромосом не очень хорошее. Метод хорошо зарекомендовал себя для поиска комплексных транслокаций. Коктейль локуспецифичных зондов при ХЛЛ показал высокие эффективность и скорость получения результатов. Цитогенетический анализ в динамике позволяет оценить особенности мутационного процесса в ходе лечения.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз, множественная миелома, первичный миелофиброз, цитогенетическое исследование, флуоресцентная in situ гибридизация, транслокации хромосом, локуспецифическое флуоресцентное окрашивание.

Автор декларирует отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФМБА России.

Благодарность. Автор выражает глубокую благодарность врачам-гематологам Русакову М.Н., Димову Г.П., сотрудникам клинического отделения ФГБУН УНПЦ РМ врачу-гематологу Бойко Д.В. и мед. сестрам Царенко Н.И. и Пятниченко Т.В. за сотрудничество в работе. Слова признательности хочется выразить старшим лаборантам лаборатории радиационной генетики Сыченко З.И., Чикиревой И.А., Киселевой Е.В. за техническое сопровождение исследований. Особые слова благодарности автор выражает руководителю регионального гематологического центра Коробкину А.В. за содействие в работе.

Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemias by Means of Methods of Molecular Cytogenetics. Characteristics of the Methodology

Vozilova A.V.

Federal State Government-Funded Institution of Science Urals Research Center for Radiation Medicine of the Federal Medical-Biological Agency, Chelyabinsk

Cytogenetic methods of cell study of bone marrow and peripheral blood in individuals with onco-hematological diseases are widely used for stating a diagnosis and severity assessment. Diversity of methods of chromosome painting enables to fully assess genetic aberrations that is important for treatment strategy identification and prediction of course and prognosis of the disease. Since laboratories often have funding limits it is important to develop approaches for selecting a cytogenetic method for the analysis. The goal of the present work is to analyze cytogenetic abnormality in bone marrow cells in individuals with chronic leukemia by means of three methods of painting that enabled to form a methodology of cytogenetic research for different groups of diseases (chronic myeloleukemia, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and primary myelofibrosis). In the present work we have used: G-banding, 24-colour FISH technique. For the individuals with CLL we have used of locus-specific probes: ATM(11q22)/TP53(17p13) and DLEU(13q14)/LAMP(13q34)/cen12(12p11.1;12q11.1). Summarizing the research results we have come to the following conclusions: differential painting enables to identify all chromosome transformations but only in case of ideal chromosome quality which is not the case with bone marrow. The use of 24-colour FISH technique enables to identify translocations even if the chromosome quality is not good. This method attained credibility for searching complex translocations. The cocktail of locus-specific probes for CLL cases demonstrated high efficiency and a high speed of obtaining results. Cytogenetic analysis in the dynamics allows evaluating the peculiarities of a mutation process in the course of treatment.

Key words: chronic myeloleukemia, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma, primary myelofibrosis, cytogenetic research, fluorescence in situ hybridization, chromosome translocations, locus-specific fluorescence painting.

Введение

Цитогенетические методы исследования клеток костного мозга и периферической крови у лиц с онкогематологическими заболеваниями широко используются во всем мире для диагностики заболеваний и для оценки степени их тяжести. В некоторых случаях на основе результатов исследования хромосом в клетках больного врач определяется с тактикой лечения, а проведенный повторно цитогенетический анализ позволяет оценить эффективность лечения [1].

Современные технические возможности, такие, как приборы для автоматического поиска метафазных пластинок, оцифровка изображений и программное обеспечение для кариотипирования хромосом, большое разнообразие методов окраски хромосом или их локусов, позволяют исследователю получить максимум информации и обнаружить не только рекуррентные для данного заболевания аберрации, но и увидеть новые перестройки, которые образовались в клетках в результате опухолевой прогрессии, и могут быть уникальными для каждого клинического случая. Возможности использования разных методов окраски, в основе которых лежит флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), могут помочь в описании полной цитогенетической картины онкогематологического заболевания. Однако каждый метод исследования довольно дорогостоящий и требует разное количество времени от момента забора образца биологического материала до получения результата (необходимо время для культивирования клеток, обработки их суспензии, окраски метафазных пластинок, оцифровки изображений и непосредственно кариотипирования). При таком разнообразии подходов и ограниченном количестве времени, учитывая поток биологического материала в лаборатории, исследователь должен определиться с методологией или критериями, которые будут использованы для получения оптимального результата.

Цель настоящего исследования заключалась в формировании методологии цитогенетического исследования для оценки цитогенетической патологии в клетках костного мозга у лиц с хроническими формами лейкозов.

Материалы и методы

Исследование было проведено с 2014 по 2016 гг. В клиническом отделении Уральского научно-практического центра радиационной медицины г. Челябинска проходили лечение лица старше 18 лет с хроническими формами лейкозов. Всего для анализа цитогенетических результатов были сформированы четыре группы пациентов: с хроническим миелолейкозом (ХМЛ), хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), множественной миеломой (ММ), первичным миелофиброзом (ПМФ). Выбор групп для исследования объяснялся высокой степенью распространенности данной патологии у взрослого населения, а также высокой вероятностью обнаружения цитогенетических аномалий при этих заболеваниях согласно данным литературы [1–3]. Больные не дифференцировались по времени постановки диагноза, по степени тяжести заболеваний и т.д. Количество обследованных лиц и типы окраски хромосом представлены в таблице.

Всего за период наблюдения было обследовано 38 человек, в динамике дважды была обследована одна женщина с диагнозом ММ. Как видно из таблицы, многие пациенты имели по два разных цитогенетических исследования. Всем больным ХЛЛ, кроме одного человека, было проведено исследование на интерфазных клетках с применением локуспецифичных зондов.

Аспират костного мозга (1 мл) после биопсии помещался в культуральную смесь, которая содержала гепарин (0,5 мл), среду RPMI-1640 (5 мл), сыворотку эмбриональную телячью (0,5 мл), колцемид. При диагнозе ХЛЛ в культуральную смесь вводили фитогемагглютинин (ФГА). Клетки культивировали 24 часа при 37°C, затем готовили препараты хромосом по принятому в лаборатории цитогенетическому протоколу [4].

Для окраски метафазных хромосом использовали дифференциальное GTG-окрашивание, которое основано на предварительной обработке хромосом трипсином [5]. Метод является «золотым стандартом» цитогенетического исследования и позволяет выявлять все известные хромосомные перестройки. Однако для анализа с использованием этого метода необходимо, чтобы метафазных пластинок на стекле было достаточное количество и хромосомы были оптимальной для анализа длины. Также метафазные хромосомы окрашивали

Таблица

**Количество обследованных лиц
с применением различных цитогенетических методов окрашивания хромосом или локусов хромосом**

Заболевание	Кол-во человек	Пол обследованных		Методы окраски		
		М	Ж	GTG	24-цветный FISH	Int FISH
ХМЛ	5	3	2	2	5	—
ХЛЛ	11	5	6	1	7	10
ММ	11	3	8	3	10	—
ПМФ	11	5	6	8	6	—

с применением метода FISH (24-цветная FISH-окраска) (пр-во Германия, Метасистемс). В результате такого подхода каждая пара хромосом имела индивидуальную окраску, что позволяло быстро и надежно определять хромосомные обмены. Для оценки генетических аномалий у лиц с ХЛЛ использовали коктейли локуспецифичных зондов для интерфазных клеток. Коктейли содержали зонды к тем участкам хромосом, которые наиболее часто мутируют при ХЛЛ: ATM (11q22)/TP53 (17p13) и DLEU (13q14)/LAMP (13q34)/cen12 (12p11.1; 12q11.1) (пр-во Германия, Метасистемс). Для флуоресцентных методик использовали протоколы, которые предлагались производителем.

Для выбора метода окрашивания сначала подсчитывали количество метафазных пластинок на неокрашенном стекле. Если при поперечном пересечении стекла находили более двух метафаз, то применяли дифференциальное окрашивание. Если при поперечном пересечении стекла находили одну клетку или одна клетка встречалась реже, то применяли мультицветное FISH окрашивание. У больных ХЛЛ при отсутствии достаточного количества метафаз окрашивали интерфазные клетки с применением локуспецифичных зондов.

Анализ хромосом проводили при световой или флуоресцентной микроскопии. Для формирования архива использовали автоматический поиск метафаз и оцифровку изображений, которую выполняли на Метафере (Германия). Анализ дифференциально-окрашенных препаратов проводили с использованием программного обеспечения (ПО) Ikaros, а флуоресцентные изображения анализировали с применением ПО Isis (Метасистемс, Германия). При анализе метафазных хромосом считали все клетки, которые были на стекле (чаще от 10 до 50 клеток). В ходе анализа с локуспецифичными зондами анализировали от 150 до 400 интерфазных клеток. Оценивали количество клеток с одним, двумя и тремя сигналами. Затем рассчитывали процент клеток в норме и при отсутствии (del) или при увеличении сигналов (трисомии). При отсутствии одного сигнала не исключался факт потери клеткой хромосомы. Чтобы избежать ошибок в анализе считали большее количество клеток. Для записи цитогенетических аномалий использовали номенклатуру [6].

Результаты

В группе лиц с ХМЛ был обследован костный мозг 5 человек. У всех пациентов было проведено исследование с применением мультицветной FISH-окраски, и у двоих пациентов была выполнена дифференциальная диагностика. У всех обследованных лиц подтвердилось наличие реципронной транслокации t(9;22)(q34;q11) с образованием маркерной Ph-хромосомы. Состояние одного больного было тяжелое, он был резистентен к химиотерапии. Поскольку клеток на стекле было крайне мало, было решено применить для окраски ме-

тод 24-цветной FISH. При анализе у него помимо Ph-хромосомы был обнаружен клон клеток, который также содержал транслокацию t(8;10)(p11;p11). По данным литературы [7], транслокации, затрагивающие регион 8p11, характерны для миелоидной опухолевой трансформации клеток. Как показывают исследования, в подобной перестройке могут участвовать два разных гена — ген *FGFR1* и ген *MOZ*. Разрыв гена *FGFR1* связан с заболеванием, известным, как миелопротеративный 8p11 синдром. У таких пациентов болезнь протекает агрессивно и быстро трансформируется в острый миелоидный лейкоз. Мы не проводили молекулярно-генетической диагностики в данном случае, но у обследуемого пациента наблюдалось агрессивное течение заболевания, которое закончилось летально. По данным литературы при наличии транслокации, охватывающей регион 8p11, помочь больному могла только аллогенная трансплантация стволовых клеток при раннем выявлении аберрации.

В группе лиц с ММ было обследовано 11 пациентов. Для этого заболевания характерно вовлечение в различные перестройки хромосомы 14 [1]. У двух больных (18% обследованных) методом мультицветной FISH выявили транслокации с участием этой хромосомы. У мужчины обнаружили t(14;18)(p11.2;q21.2), и в двух клетках выявили делецию хромосомы 14 (del 14p11.2), т.е. аномалия затрагивала тот же регион, что был вовлечен в транслокацию. У женщины 56 лет в одной клетке было обнаружено наличие двух транслокаций t(4;14) и t(12;18). Необходимо отметить, что для сравнения эффективности методов окрашивания у двух пациентов применили GTG-окрашивание и FISH. Результаты не противоречили друг другу, но информативнее был флуоресцентный метод. Согласно работе [2], стандартным окрашиванием можно оценить цитогенетическую патологию только у 30% пациентов с этим диагнозом. Результаты FISH-анализа демонстрируют более высокий уровень детекции генетических аномалий при ММ. В нашем исследовании для лиц с диагнозом ММ было характерно присутствие клеток с нормальным кариотипом более чем в 50% случаев. Необходимо отметить, что в этой группе больных в клетках костного мозга чаще отмечались анеуплоидии и случаи кратного увеличения генома. У одной больной исследование было проведено дважды с перерывом в несколько месяцев для оценки эффективности лечения. После лечения количество клеток с нормальным кариотипом увеличилось вдвое (с 35% до 75%). В этой группе больных были отмечены делеции хромосом 1p, 5q, 5p, 11q, 13p, 13q, 14p, 17p.

В ходе исследования клеток костного мозга у больных с диагнозом ПМФ (всего 11 человек) у половины наблюдалась полиплоидия (от 50 до 132 хромосом). В этой группе было выполнено больше всего анализов с применением дифференциальной окраски — 8. В ходе цитогенетического анализа была обнаружена одинаковая аберрация — del 2q23 у двух пациентов (мужчина

56 лет и женщина 43 лет). В литературе мы не нашли подобных примеров [1, 8]. У трех пациентов были отмечены клетки с трисомией по хромосоме 21, что считается благоприятным прогностическим признаком при данном заболевании. Результаты исследований в этой группе показали, что чаще обнаруживались числовые аномалии, нежели чем структурные, что может быть связано с недостаточностью времени культивирования клеток костного мозга.

В группе лиц с диагнозом ХЛЛ было обследовано 11 человек. В 10 случаях было применено FISH-окрашивание интерфазных клеток с локуспецифичными зондами. В этой группе отмечался низкий пролиферативный индекс. В клетках костного мозга у 27% обследованных выявили трисомию по 12 хромосоме. У 50% пациентов были отмечены *del* 17p(TP53) и *del* 13q14(DLEU). В 7% случаев нами была отмечена *del* 11q22. В ходе хромосомного анализа методом FISH у одной пациентки выявили клон клеток с 4 транслокациями (*t*(3;7), *t*(4;17), *t*(4;5), *t*(7;13)). В других клетках эти аберрации встречались по отдельности, 14% клеток больной имели нормальный кариотип. У этой пациентки также обнаружили транслокацию с вовлечением хромосомы 14 *t*(14;17), которая наиболее часто мутирует при лимфатических опухолях. У одной больной в 8% клеток выявили транслокацию с вовлечением первой хромосомы *t*(1;12)(q43;p12). У двух пациентов была отмечена трисомия по хромосоме 21.

Обсуждение

Цитогенетическое исследование костного мозга онкогематологических больных трудоемкий и дорогостоящий процесс, который играет существенную роль в постановке диагноза и в выборе тактики лечения. Учитывая, что при малигнизации клеток не всегда удается получить качественные хромосомы, чтобы провести исследование методом дифференциальной окраски хромосом, цитогенетику важно определиться с выбором методов, которые помогут получить исчерпывающую информацию о хромосомной патологии.

В ходе выполнения цитогенетических исследований у лиц с хроническими лейкозами, которые проходили лечение в клиническом отделении ФГБУН УНПЦ РМ, специалисты лаборатории радиационной генетики сформировали методологию, которая позволяет эффективно использовать современные лабораторные возможности. Исследовались четыре группы больных с диагнозами: ХМЛ, ММ, ПМФ, ХЛЛ. По данным литературы, при этих заболеваниях от 30% и более пациентов имеют аномалии кариотипа. Оценивались клетки костного мозга, которые культивировались 24 часа. При ХЛЛ клетки дополнительно стимулировали ФГА. Метод окрашивания выбирался индивидуально в зависимости от качества препарата и диагноза пациента. Если метафазных пластинок было мало, то применяли мульт-

цветное FISH-окрашивание, если наоборот, то хромосомы окрашивали дифференциально с применением трипсина. Для отбора максимального количества метафаз со стекла использовали прибор для автоматического поиска клеток и оцифровывания изображений. В нашем случае это был Метафер (пр-во Германия). Все препараты больных ХЛЛ были окрашены с применением локуспецифичных зондов.

Результаты исследования показали, что при высоком митотическом индексе и достаточной длине хромосом дифференциальное окрашивание позволяет выявлять возможные структурные перестройки хромосом (делеции, инверсии, транслокации и т.д.) и числовые нарушения. Однако этот анализ требует большого количества времени, и идеального качества хромосомных препаратов, что в онкогематологии бывает нечасто. В случае работы с 24-цветным FISH транслокации выявлялись быстрее даже при не очень хорошем качестве и разбросе хромосом. Метод хорошо зарекомендовал себя при анализе комплексных транслокаций, которые невозможно было полноценно оценить при дифференциальном окрашивании [9]. Наименьшее количество цитогенетических аномалий было отмечено в группе лиц с ПМФ. Такой результат можно объяснить тем, что мы культивировали клетки в течение 24 часов, что могло быть недостаточно для выхода клеток в митоз. В работе [8] указывается, что если время культивирования клеток больных ПМФ увеличить до 48 часов, то увеличится количество детектируемой цитогенетической патологии.

Используемый в нашем случае коктейль локуспецифичных зондов на интерфазные клетки при с ХЛЛ показал высокую эффективность. Этот подход позволил ускорить время получения результата, поскольку не требовалось культивировать клетки. Работа с интерфазными ядрами и применение FISH позволило уточнить частоту встречающуюся патологию при данном лимфопролиферативном заболевании. Так, по данным литературы, при ХЛЛ наиболее часто выявляется делеция длинного плеча хромосомы 13 (55%), охватывающая регионы 13q12 и 13q14. В регионе 13q14.3 располагается онкосупрессорный ген ретинобластомы (*Rb1*), кодирующий ядерный белок фосфопротейн, участвующий в регуляции клеточного цикла. Чуть реже обнаруживаются трисомия хромосомы 12 (18%) и делеция хромосомы 11 (16%). Трисомия 12 коррелирует с атипичными морфологическими вариантами ХЛЛ, с повышенным содержанием пролимфоцитов и aberrантным иммунотипом. Делецию 11q, как правило, отмечали у больных в более молодом возрасте, она ассоциируется с быстрым прогрессированием заболевания и плохим прогнозом. С неблагоприятным прогнозом ассоциируется также делеция 17p13. В этом регионе располагается онкосупрессорный ген *p53*, непосредственно участвующий в индукции апоптоза при повреждении генома клеток [10]. Результаты нашей работы подтверждают вышеизложенное.

Заключение

Подводя итоги исследованию, которое было проведено в 2014—2016 гг. в лаборатории радиационной генетики совместно с клиническим отделением ФГБУН УНПЦ РМ г. Челябинска, можно резюмировать, что информация, полученная с применением разных методов окрашивания хромосом, была не противоречива, а, наоборот, с применением нового цитогенетического подхода дополнялась или уточнялась. Каждый конкретный онкогематологический случай — индивидуален и требует индивидуальных подходов в диагностике. Результаты исследования в некоторых случаях (например, при обнаружении транслокации 8p) нуждались в подтверждении путём секвенирования генов, которые могли бы быть вовлечены в хромосомные перестройки. Как нам кажется, при таком комплексном подходе к молекулярно-цитогенетической диагностике лейкозов могут быть решены тактические задачи по выбору правильной и эффективной терапии, что увеличило бы процент положительных исходов в лечении заболеваний. Считаем, что цитогенетическое исследование клеток костного мозга необходимо проводить в динамике для оценки эффективности лечения и выявления онкогенных клонов клеток. Большим недостатком при исследовательской работе является то, что часть пациентов уходит из под наблюдения конкретного лечебного отделения, и не существует единой базы данных с информацией о пациенте, что не позволяет проводить анализ ситуации с учетом цитогенетической патологии. К примеру, за период наблюдения в динамике нами была обследована только одна пациентка, а из 38 обследованных нами лиц на сегодняшний день нам не известно состояние 16 чел. (42%). Все это не позволило нам проанализировать как влияет цитогенетическая патология на результаты лечения и состояние больного.

Список литературы

1. Kaushansky K., Lichtmann M., Prchal J., Livi M., Press O., Burns L., Caligiuri M. Williams Hematology 9th Edition. 2016, McGraw-Hill Education ISBN: 978-0-07-183301-1.
2. Гариффулин А.Д., Волошин С.В., Мартынкевич И.С., Клеина Е.В., Салогуб Г.Н., Карягина Е.В., Абдулкадыров К.М., Чететкин А.В. Генетические аномалии: влияние на эффективность терапии, выживаемость больных множественной миеломой, роль в оценке минимальной остаточной болезни. Медицинская генетика. 2016;9:29-39.
3. Мещерякова Л.М., Пороткова О.В., Ковалева Л.Г., Колозова Л.Ю., Бычкова С.Н. Первичный миелофиброз. Онкогематология. 2011; 4:50-57.
4. Vozilova A.V., Shagina N.B., Degteva M.O., Akleyev A.V. Chronic radioisotope effects on residents of the Techa River (Russia) region: Cytogenetic analysis more than 50 years after onset of exposure. Mutation Research. 2013;756 (1-2):115-118.
5. Estandarte Ana Katrina C. A Review of the Different Staining Techniques for Human Metaphase Chromosomes Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Masters in Research at the University of London February 24, 2012.
6. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). ISBN 978-3-318-02253-7
7. Macdonalda D., Reiterb A., Cross N. The 8p11 Myeloproliferative Syndrome: A Distinct Clinical Entity Caused by Constitutive Activation of FGFR1. Acta Haematol 2002;107:101-107.
8. Гиндина Т.Л., Мамаев Н.Н., Байков В.В., Барабаншикова М.В., Николаева Е.Н., Петрова И.А., Моисеев И.С., Пирогова О.В., Власова Ю.Ю., Иванова М.О., Морозова Е.В., Бондаренко С.Н., Афанасьев Б.В. Новые горизонты цитогенетики при первичном миелофиброзе. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2016;9(1):61-69.
9. Loucas BD, Shuryak I, Cornforth MN. Three-Color Chromosome Painting as Seen through the Eyes of mFISH: Another Look at Radiation-Induced Exchanges and Their Conversion to Whole-Genome Equivalency. Front Oncol. 2016 Mar 15;6:52. doi: 10.3389/fonc.2016.00052.
10. Д.Ф. Глузман Л.М., Скляренко Т.С., Иванивская С.В., Коваль Н.К., Родионова Н.И., Украинская Л.Ю., Полудненко А., Джалилов Хронический лимфолейкоз: лабораторная диагностика и критерии прогноза. Онкология. 2014;16(3):171-176.