

Аномалии хромосом 5, 7, 11 и 17 в комплексном кариотипе при миелодиспластических синдромах и острый миелоидных лейкозах

Гребенюк Л.А., Обухова Т.Н., Паровичникова Е.Н., Алимова Г.А.,
Шишигина Л.А., Троицкая В.В., Кохно А.В., Савченко В.Г.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Комплексный кариотип (КК) у больных миелодиспластическими синдромами (МДС) и острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) является фактором неблагоприятного прогноза, связан с высокой частотой рефрактерных форм и рецидивов. При стандартном цитогенетическом исследовании (СЦИ) идентификация хромосомных аномалий в КК затруднена в связи с низкой разрешающей способностью метода. Молекулярно-цитогенетические методы — iFISH, mFISH, mBAND, позволяют идентифицировать сложные и субмикроскопические хромосомные перестройки, маркерные хромосомы и уточнять точки разрыва хромосом. Этими методами охарактеризованы КК 15 больных МДС и 11 ОМЛ. mFISH и iFISH выполнены всем 26 больным, mBAND выполнен в двух случаях. При СЦИ выявлено в среднем 7 аномалий кариотипа (3-21). Структурные аномалии выявлены во всех случаях ($n = 26$): реципрокные транслокации (38,4%), делеции (65,3%), дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения (69,2%), маркерные хромосомы (53,8%). Обнаружены числовые аномалии типичные для МДС и ОМЛ ($n = 26$): три-сомия 8 (15,3%), моносомии 5 (42,3%), 7 (34,6%) и 17 (11,5%). Молекулярно-цитогенетические методы выявили дополнительные аномалии и/или дополнительные точки разрыва хромосом в 19 случаях. Выявлены транслокации: реципрокные — 22 случая, сложные — 13 случаев. У 23 пациентов обнаружены аномалии хромосом 5 (76,9%), 7 (57,6%), 11 (34,6%) и 17 (46,1%). Подтверждены делеции 5q в пяти случаях, делеция 7q в одном случае. Истинная моносомия 7 подтверждена в одном случае. Остальные случаи моносомии 5, 7 и 17 молекулярно-цитогенетическими методами идентифицированы как транслокации с делециями локусов 5q31, 7q31 и 17p13. Все маркерные хромосомы и дополнительный неидентифицируемый хромосомный материал распознаны как сложные транслокации или деривативные хромосомы. Сочетание стандартного и молекулярно-цитогенетических методов исследования необходимо для полной характеристики комплексных кариотипов при МДС и ОМЛ и определения точек разрыва хромосом в локусах потенциальных онкогенов и генов супрессоров опухолевого роста.

Ключевые слова: МДС, ОМЛ, комплексный кариотип, FISH, mFISH.

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Исследование выполнено при поддержке ООО «Новартис-Фарма».

Anomalies of chromosomes 5, 7, 11 and 17 with complex karyotype in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients

Grebenuk L.A., Obukhova T.N., Alimova G.A., Shishigina L.A.,
Troitskaya V.V., Kokhno A.V., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Complex karyotype (CK) in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML) is a factor of unfavorable prognosis, associated with high frequency of refractory forms and relapses. Precise identification of chromosome abnormalities in CK by conventional cytogenetic analysis (CCA) is limited due to low resolution of this method. Molecular cytogenetic techniques (FISH, mFISH, mBAND) have significantly higher sensitivity and allow to identify complex chromosome abnormalities, marker chromosomes, submicroscopic deletions and specify chromosome breakpoints. This study included 15 MDS and 11 AML patients whose complex karyotypes were characterized by these methods. mFISH and iFISH are performed in all 26 patients, mBAND is performed in two cases. CCA revealed an average of 7 karyotype abnormalities (from 3 to 21). Structural rearrangements were found in all cases ($n = 26$): reciprocal translocations (38.4%), deletions (65.3%), additional chromosomal material of unknown origin (69.2%), marker chromosomes (53.8%). Numerical anomalies typical for MDS and AML ($n = 26$) were found: trisomy 8 (15.3%), monosomy 5 (42.3%), 7 (34.6%) and 17 (11.5%). Molecular cytogenetic analysis revealed additional chromosomal abnormalities and / or additional chromosome breakpoints in 19 cases. Translocations were found: reciprocal in 22 cases, complicated in 13 cases. In karyotype of 23 patients we found chromosome anomalies 5 (76.9%), 7 (57.6%), 11 (34.6%) and 17 (46.1%). The deletion 5q was confirmed in five cases, the deletion of 7q in one case. True monosomy 7 is confirmed in one case. On the results of molecular cytogenetic techniques in all other cases with monosomy 5, 7, and 17 revealed fragments of these chromosomes involved in translocations were combined deletions of loci 5q31, 7q31 and 17p13. All marker chromosomes and chromosomes with additional material of unknown origin were recognized as complex translocations or derivative chromosomes with breakpoints in both arms. Combination of CCA and molecular cytogenetic techniques is necessary for the complete characterization of complex karyotypes in MDS and AML and for precise characterization of CK in MDS and AML and determination of exact breakpoints loci of potential oncogenes and tumor suppressor genes.

Keywords: AML, Complex aberrant karyotype, FISH, MDS.

Введение

Миелодиспластические синдромы (МДС) и острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) — опухолевые заболевания системы крови, патогенез которых обусловлен генетическими нарушениями в стволовых гемопоэтических клетках. Для установления точного диагноза, классификации МДС и ОМЛ и определения группы риска необходимо выполнение стандартного цитогенетического исследования (СЦИ).

Клональные хромосомные нарушения обнаруживаются почти в половине всех случаев МДС, из них 8–10% больных имеют комплексный кариотип (КК) — 3 и более хромосомные аномалии в пределах одного клона [1].

Различные хромосомные нарушения обнаруживаются в кариотипе у более 50% больных ОМЛ. Многие из этих нарушений являются независимыми прогностическими факторами и включены в современную классификацию ВОЗ [2]. Приблизительно у 10% больных выявляется КК (3 или более хромосомных aberrаций при отсутствии одной из транслокаций или инверсий, указанных в классификации ВОЗ) [3]. КК ассоциирован с плохим ответом на проводимую терапию, короткой продолжительностью жизни больных МДС и ОМЛ, и является самым неблагоприятным прогностическим фактором [4–8]. Также к группе крайне неблагоприятного прогноза можно отнести больных ОМЛ с так называемым моносомным кариотипом (в кариотипе присутствуют две и более моносом или одна аутосомная моносомия в сочетании с как минимум одной структурной хромосомной аномалией) [9].

Множественные хромосомные изменения в кариотипе больных МДС и ОМЛ вероятно могут быть результатом клональной эволюции [10] и методом СЦИ не все нарушения идентифицируются, в связи с ограниченной разрешающей способностью этого метода (10–12 млн п.н.). Реципрокные транслокации и сложные транслокации с участием трех и более хромосом, могут сопровождаться делециями локусов генов потенциальных супрессоров опухолевого роста. Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* на интерфазных ядрах (iFISH) с использованием локус-специфичных ДНК-зондов обладает высокой чувствительностью (10–50 тыс. п.н.) и позволяет выявлять субмикроскопические делеции и транслокации с делециями локусов известных и потенциальных генов, участвующих в патогенезе МДС и ОМЛ [11–13].

Чувствительность метода многоцветной флуоресцентной гибридизации *in situ* (multicolor FISH — mFISH) составляет 3 млн п.н., что позволяет выявлять скрытые и сложные хромосомные нарушения, множественные перестройки в обоих плечах хромосом и нераспознаваемый при СЦИ хромосомный материал, однако требует наличия метафаз хорошего качества. Многоцветная идентификация хромосом высокого разрешения (multicolor banding — mBAND) позволяет иденти-

фицировать внутрихромосомные нарушения, а также дает возможность идентифицировать точки разрывов хромосом [14, 15].

Таким образом, целью настоящего исследования явилась характеристика КК больных МДС и ОМЛ с использованием комбинации молекулярно-цитогенетических методов iFISH, mFISH и mBAND.

Материалы и методы

В 2014–2016 гг. в лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России на момент установления диагноза СЦИ клеток костного мозга выполнено 362 больным МДС и 163 больным ОМЛ. В настоящее исследование включены 26 пациентов с КК (13 мужчин и 13 женщин, средний возраст 59,8 года): 15 больных МДС (4,1%) и 11 больных ОМЛ (6,7%).

Клетки костного мозга культивировали в течение 24 часов с применением питательной среды RPMI-1640 с глутамином (НПП “ПанЭко”, Россия), с добавлением 20% сыворотки крупного рогатого скота (Biosera, France), антибиотиков. G-дифференциальное окрашивание хромосом проводили с использованием краски Wright (Merck, Germany). По возможности анализировали 20 метафаз. Кариотип описывали в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой ISCN (2013) [16]. Клональными нарушениями считались структурные хромосомные нарушения и дополнительные хромосомы обнаруженные в минимум двух метафазах, моносомии в трех и более метафазах.

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* на интерфазных ядрах (iFISH) с ДНК-зондами выполняли согласно протоколам фирм-производителей: LSI EGR1/D5S23, D5S721 Dual Color Probe Set, TP53/CEP 17 FISH Probe Kit, D7S522/CEP 7 FISH Probe Kit, CEP 8 Spectrum Orange DNA Probe Kit, ATM/CEP 11 FISH Probe Kit, LSI MLL Dual Color Break Apart Rearrangement, D20S108 FISH Probe Kit, 1p36 Microdeletion Region Probe — LSI p58 (1p36) (SO)/TelVision 1p (SG)/LSI 1q25 (SA) (Abbott Laboratories, U.S.A.); Del(7q) Deletion, Del (5q) Deletion (Aquarius CytoCell, UK); XL 5q31 / 5q33 / 5p15, XL AML1, WCP7 Texas Red (MetaSystems, Altlußheim, Germany). Анализ проводили под флуоресцентным микроскопом Zeiss Axioskop (Zeiss, Jena, Germany). Анализировали не менее 200 интерфазных ядер для каждой пробы.

Всем 26 больным с КК выполняли mFISH. В двух случаях выполнена mBAND для хромосом 5, 7, 15, 17. Использовали пробы 24XCyte, XCyte mBAND 5, XCyte mBAND 7, XCyte mBAND 15, XCyte mBAND 17 с набором из 5 флуоресцентных красителей: DEAC, FITC, Spectrum OrangeTM, Texas Red®, CyTM5 (MetaSystems, Altlußheim, Germany). Препараторы анализировали под флуоресцентным микроскопом Zeiss Axioskop с использованием специального программного обеспечения ISIS (MetaSystems, Altlußheim, Germany).

Результаты

В результате СЦИ клеток костного мозга больных МДС ($n = 362$) хромосомные нарушения выявлены у 40,2% больных, нормальный кариотип у 53,3% больных и митозы отсутствовали в 6,5% случаев.

При СЦИ клеток костного мозга больных ОМЛ ($n = 163$) хромосомные нарушения обнаружены у 44,2% больных, нормальный кариотип выявлен у 43,9%, митозы отсутствовали в 11,6% случаев.

По результатам СЦИ КК обнаружен у 18 (4,9%) больных МДС и у 14 (8,5%) больных ОМЛ. Шесть пациентов (три случая МДС и три ОМЛ) не были включены в исследование в связи с недостаточным количеством анализируемого материала (рис. 1).

При СЦИ выявлено от трех до 21 нарушений, в среднем 7 аномалий на кариотип. В кариотипе десяти пациентов выявлено от трех до пяти хромосомных нарушений, у 11 больных — от шести до восьми, у четырех больных обнаружено более десяти нарушений. Структурные хромосомные аномалии выявлены во всех случаях ($n = 26$): реципрокные транслокации в 38,4%, делеции в 65,3%, дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения в 69,2%, маркерные хромосомы 53,8%. Дополнительные хромосомы (три- и тетрасомии) обнаружены в девяти случаях, в четырех случаях из них трисомия 8. Моносомии выявлены в 19 случаях, при этом чаще отсутствовали хромосомы 5 (42,3%), 7 (34,6%), 17 (11,5%). Результаты СЦИ, mFISH и iFISH представлены в таблице.

В результате исследования КК молекулярно-цитогенетическими методами обнаружено от двух до 16 анома-

лий, в среднем 6 нарушений на кариотип. Дополнительные аномалии и/или дополнительные точки разрыва хромосом выявлены в 19 случаях (73%).

В 25 из 26 проанализированных кариотипов выявлены транслокации. Делеции различных хромосом выявлены в 24 из 26 случаев (рис. 2). В 18 случаях обнаруженные транслокации сопровождались делециями. Простые транслокации, обнаруженные только при СЦИ, подтверждены в пяти случаях. В двух случаях выявлен другой хромосомный партнер в транслокации (#6, 22), у двух больных (#7, 11) в кариотипе выявлены сложные транслокации с вовлечением четырех и пяти хромосом соответственно. Трисомии обнаружены в 11 случаях. Выявленные при СЦИ трисомии подтверждены в восьми из них. Методом mFISH в кариотипе больного #5 трисомия 2 идентифицирована как сложная транслокация t (2;3;10). В двух случаях обнаружены трисомии не выявленные при СЦИ: в кариотипе больного #6 обнаружена трисомия 8, у больного #16 обнаружена трисомия 22. У больного #14 трисомия 8 не подтверждена, но выявлена трисомия 21.

У 23 больных из 26 выявлены аномалии хромосом 5 (76,9%), 7 (57,6%), 11 (34,6%), 17 (46,1%).

Хромосома 5. Структурные хромосомные нарушения выявлены у 20 больных (76,9%). В семи случаях (# 2, 4, 5, 9, 10, 12, 25) при СЦИ обнаружена делеция 5q (5q13-q31). У пяти больных (#2, 4, 5, 10, 12) делеция 5q31 подтверждена молекулярно-цитогенетическими методами, в двух случаях (#9, 25) хромосома 5 вовлечена в сложные транслокации (с участием трех хромосом) с делецией 5q31.

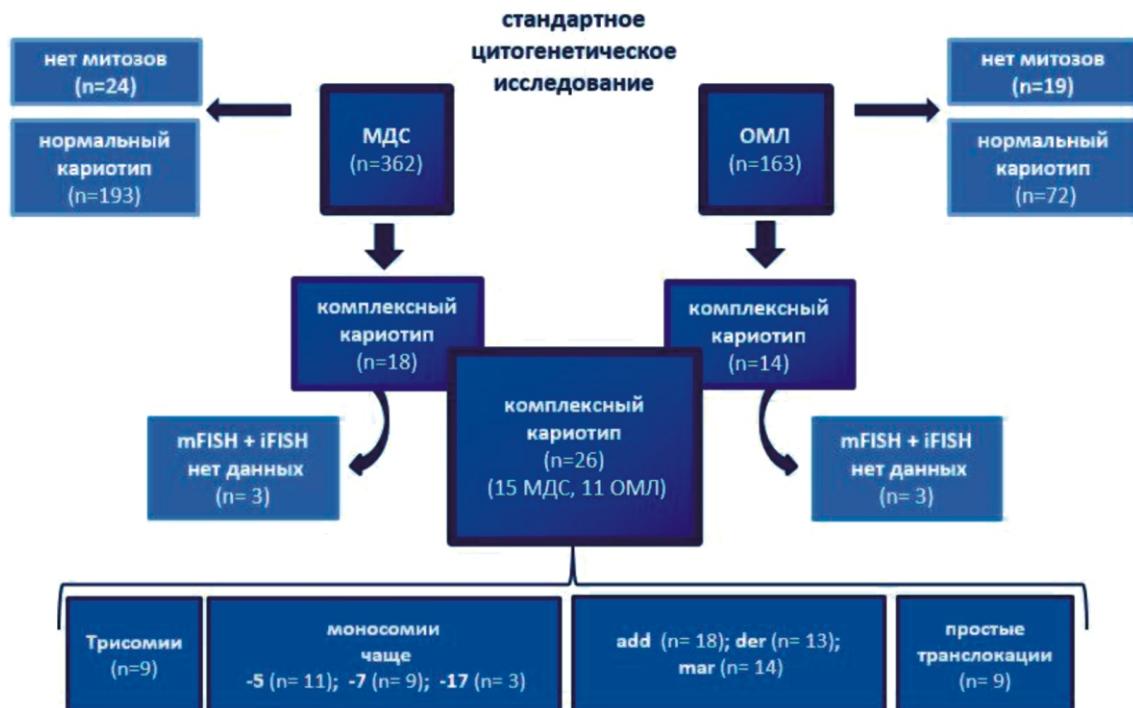


Рис. 1. Результаты стандартного цитогенетического исследования.

Таблица

Результаты СЦИ, mFISH и iFISH. В последнем столбце таблицы приведены заключительные результаты молекулярно-цитогенетического исследования, обобщающие данные трех методов

N п/п	Кариотип (СЦИ)	Кариотип (iFISH + mFISH)
1	43-44, X, der(X) or mar, der(2)(q22), der(4)?add(p10), -5, ?der(8), der(9)add(?q34), i(12)(p10), -18, der(19), + mar [cp15]	43-44, X, der(X)t(X;1;18), t(2;8), t(4;4), del(5)(q31), i(12), -18[cp5] del 5q31
2	46, XX, -2, add(3)(?p35), del(4)(q21)x2, del(5)(q13q33), add(11)(p15), add(12)(p13), add(20)(q13)[10]	46, XX, der(2)del(2p)del(2q), -4, del(5)(q31), t(6;13), der(11)t(4;11)[3] del 5q31 amp MLL
3	45, XX, der(2)?del(q31), -5, der(17)t(5;17)(p11;q10)[19] /46,XX[1]	45, XX, del(2)(q31), t(5;17)(p11;p13)[3] del 5q31 del 17p13/TP53
4	47, XX, der(1)add(p36), del(5)(q15q33), -7, +8x2, der(13)add(q33)[19] / 47,XX,idem,der(2)[1]	47, t(X;7;20), X, t(1;5;7;13;14;15;17;20), del(5)(q31), +8x2, -17[5] del 5q31 del 7q31 del 17p13/TP53
5	54-61, XX, +2, +del(3)(q11), +4, del(5)(q13q33), +6, ?-7, +8, ?+del(9)(q21), +add(11)(p?15), -12, +13, +14x2, +15, ?del(17)p(12), +19, +20, +21, +22, +3 mar [cp10] / 46, XX, idem, +mar? del(7)(q22)[10]	54-61, XX, t(2;3;10), t(10;14) or t(2;3;10;14), +der(2)t(2;20;22), t(4;12), del(5)(q31)x2, +5, +6, t(7;11), del(7)(q31), +8x2, +13, +14, +15, +21, +22[cp7] del 5q31 del 7q31 amp MLL
6	46, XX, t(2;5)(p15;?q15), t(6;9)(p23;q24), add(17)(q24)[20]	46, XX, t(2;17)(p10;q21), t(3;5)(p10;q10), t(6;9)(p23;q34), +8[3] del 5q31
7	45, XX, t(2;3)(p24~25;q36), -5, del(13)(q14q22) [5] / 46,XX[5]	45, XX, del(2)t(2;3;5;11)(3?p,?,?,?)t(2;13)[cp3] del 5q31
8	46, X, add(X)(p22), del(6)(q22), add(21)(q22) [19] / 47,XX,+8[4]	46, X, t(X;6;21)[5] / 47, XX, +8[5]
9	46, X, der(X), add(1)(p35-36), del(5)(q13q33), -6, der(7), del(13)(q14), der(21), +mar [8] / 46, XX [9]	45, X, -X, t(1;5;22), del(5)(q31), t(6;13), del(13)(q14)[6] del 5q31
10	45-46, XX, 1qh+, der(3), der(4), del(5)(q13q33), del(6)(q22), der(8), -9, add(11)(q24), add(22)x2 [cp 10] / 46,XX,1qh+[20]	45-46, XX, 1qh+, t(3;6)(p12;q12), der(4)t(4;8;11)(q13;q21;q24), del(5)(q13q33), -6, +der(8)t(4;8)(q31;q21), -9, der(22)t(9;22)(p21;q12), der(22)t(1;22)(p35;p12)[cp7] del 5q31
11	47, XX, t(2;12)(p13;p13), +4, del(12)(p10), del(13)(q21)[cp7]	47, XX, t(X;2;8;12;12;15), +4, +20, -9, -15, del(8)(q10), t(9;20)(?q;q13)[cp4]
12	44-45, X, -X, del(5)(q15q33), add(6)(p?22-25), del(7q22), add(11)(p?15)[16] / 45- 46, X, idem, add(19)(q?13), +mar / 46,XX[1]	45, X, -X, der(1)t(1;21)(p36;?), del(5)(q13q33),der(6)t(6;11;19)(p22;p15;?), der(7)t(7;20)(?;?), -19[8] del 5q31 del 7q31
13	45, XX, inv(3)(q21q26), -5, t(7;11)(q22;q13), -17, +mar or del(17)(q10)[19] / 45, XX, idem, add(7)(q22)[1]	46, XX, inv(3)(q21q26), del(5)(q31), t(7;11)(q22;q13), del(13)(q13), del(17)(p10)[6] del 5q31 del 7q31 del 17p13/ TP53
14	45-47, XY, -5 or del(5q), -7, +8, -18, add(20)(q13), +1-3 mar [cp18] / 46,XY[2]	45-47, XY, t(5;20), del(5)(q31), t(7;16), -16, del(12), +21/43, X, -Y, t(1;20),t(5;7;17), t(19;21), -20, -21[cp4] del 5q31 del 7q31 del 17p13/ TP53
15	44-45, XY, add(16)(?p10) or t(16;17)(p10;q10), -17, ?der(20) or -20,+ mar [cp 20]	45, XY, t(16;17)(p10;q10), -20[3] del 17p13/ TP53

Таблица (окончание)

N п/п	Кариотип (СЦИ)	Кариотип (iFISH + mFISH)
16	46, XY, -3, -5, add (17)(?p11-13), der(20) or del (20), + 2 mar [20]	46, XY, t(3;22), t(5;17), +22[3] del 5q31 del 17p13/ TP53
17	45-47, XY, +2, ?der(3), -5, del(7)(q22), -12, +mar [cp14]/ 45-47, XY, idem, +8[1]/ 46,XY[4]	47, XY, t(1;5)(?;?), del(7)(?q22), +8[cp5] del 5q31 del 7q31
18	47, XY, -7, +13, i(17)(q10), +mar[20]/46,XY[5]	47, XY, der(7)del(7)(p)del(7)(q), +13, i(17)(q10)[5] del 7q31 del 17p13/ TP53
19	42-44, XY, del(2)(p21), -5, -7, del(12)(p12), -12, -13, -15, -16, -17, -19, + 6-7 mar [cp30]	42-44, XY, t(5;15;17;22)(?p;q?;q2?1;p10), der(7)del(7)(p10)t(7;13)(q22;q?14), del (13)(?q13),del(15)(q?2), der(17)t(16;17;19;21)(q10;?;?;q10)[cp10] del 5q31 del 7q31 del 17p13/ TP53
20	43, XY, -5, -7, -11, der(12)t(5;12)(q31;q12), der(14)add(p11) or t(14;?20)(p11;q13?), der(18)t(11;18)(q21;q22), -20, + mar [cp10]	43,XY, -7, der(11)del(11)(p?15)t(11;18)(q?21;q22), t(14;20)(p11;?q), der(12)t(5;12)(?q32;q12), del(19)(p?;?q)[cp10] del5q31 истинная моносомия 7
21	45, XY, del(3)(q31) or t(3;?), add(4)(q?35), -5 or del(5)(q15), -7 or del(7)(q22), ?del(11)(q23), ?-17 or add(17)(p?), ?-18, add(19)(q13), +21, +22, dmin [cp12]/ 43,XY, idem, ?+2, i(13)(q10) [1]/ 46,XY,[2]	45, XY, t(3;18;22)(p?;?q10;?q10), t(5;17)(?;?q15), i(13)(q10), ?dic(7;19)(?q22;?q?), +21[cp5] del 5q31 del7q31 del 17p13/ TP53
22	42-45, XY, der(5), -7, der(15)t(14;15)(14qter->14q?13::15q10->15qter), ?-18, -20, +mar der(7)?, idic(22)(22qter->22q10::22q10->22qter), dmin [cp11]/ 46,XY,[1]	45, XY, t(5;18), t(7;14), del(15)(q?)t(15;20), idic(22)[6] del 5q31 del 7q31
23	43, XY, -5, add(6)(p25), t(7;12)(q35;q10), del(11)(p15), -12, t(15;19)(q15;q13), -15, der(21) [55]/ 46,XY [5]	46, XY, t(5;21), t(6;11), t(7;12), -12, -15, t(15;19)[8] del 5q31 del 7q22
24	45-53, XY, +1, +2, +6, +?18, +?20, +?21, +2-3mar, + idic(?), + ?trc(?9;11?;?) or mar [9]	54, X, t(Y;15;19), +1, +2, t(4;15;16;18;22),+6, +18, +21, -16, der(18), +der(7)del(7)(p?)del(7)(q?), +8, +14, del(19)(p10)[4] del 7q31 del 17p13/ TP53
25	45, XY, der(1), del(5)(q13q33), -7, der(11), add(15)(p11), der(16), ?del(18)(q23), add(19)(q13)[19]/ 46,XY[1]	45, XY, t(1;5;7), del(5)(q13q33), t(11;15;16), der(19)t(11;19)[3] del 5p15 del 5q31 del 7q31 dup MLL
26	46, XY, del(4)(q21), t(8;12) or ins (8;12)(q21;p13p13), der(13) or inv(13)(q32q13), add(17)(p13), del(22)(q11) [23]	46,XY,t(4;21)(q21;q21), t(8;12)ins(13;8)(q14;q22;p12), t(17;18)(q12;p11)[5]

При СЦИ моносомия 5 обнаружена у 11 больных (#1, 3, 7, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 23). Из них два случая моносомии 5 (#1,13) по результатам исследования методами iFISH и mFISH идентифицированы как делеции 5q (точка разрыва 5q31). Во всех остальных случаях хромосома 5 вовлечена в транслокации с делецией 5q31. В случае (#6) обнаруженная при СЦИ транслокация t(2;5) определена как транслокация t (3;5) с делецией

длинного плеча хромосомы 5 (del 5q31). Истинной моносомии 5 ни у одного больного не выявлено.

Хромосома 7. При СЦИ аномалии хромосомы 7 выявлены у 15 больных (57,6%): простые реципрокные транслокации обнаружены в двух случаях (#13,23), делеция 7q в двух случаях (#12, #17), моносомия 7 у девяти больных (#4, 5, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 25). Молекулярно-цитогенетическими методами выявлены в случае #12

транслокация с вовлечением хромосомы 7 с делецией 7q31, в случае #17 подтверждена делеция 7q31. В двух случаях (#18, #24) обнаружен дериват хромосомы 7 (*der* (7) *del* (7) (*p?*) *del* (7) (*q?*)), поэтому в кариотипе больного #18 моносомия 7 не подтверждена, а в случае #24 выявлено дополнительное нарушение, не обнаруженнное при СЦИ. Истинная моносомия 7 выявлена только у одного больного (#20), в остальных случаях выявлены транслокации с вовлечением хромосомы 7 с делецией 7q31.

Хромосома 11. При СЦИ аномалии хромосомы 11 выявлены 9 случаях (34,6%) (##2, 5, 7, 10, 12, 20, 21, 23, 25). В четырех случаях (##2, 5, 10, 12) обнаружен дополнительный неидентифицируемый материал на 11p, в случае #10 на 11q. Делеция 11p (#23), делеция 11q (#21), дериват 11 (#25) обнаружены по одному случаю каждый. Методом mFISH установлено, что аномалии хромосомы 11 представлены транслокациями, в случаях #7, 10, 12, 25 сложными транслокациями. В случае #7 при СЦИ аномалии хромосомы 11 не выявлены, только методом многоцветного кариотипирования обнаружена сложная транслокация *der*(2)*t*(2;3;5;11)(?q10;?;?;p10)t(2;13).

В кариотипах больных (##2, 5, 25) с использованием локусспецифичных ДНК-зондов к регионам 11q22/ATM, 11q23/MLL и центромере хромосомы 11 выявлены дупликация 11q23/MLL (#25), амплификация MLL (до 12 копий на ядро) (##2, 5).

При СЦИ моносомия 11 выявлена только в одном случае (#20), методами FISH обнаружены делеции ко-

роткого плеча хромосомы 11 и транслокация части 11q на длинное плечо хромосомы 18 (*der* (11) *del* (11) (*p?*15) *t* (11;18) (*q?*21; *q*22)), точка разрыва расположена выше локуса гена *MLL*/11q23.

Транслокации с вовлечением локуса гена *MLL*/11q23/*MLL* и делеции 11q23/*MLL* ни у одного больного не выявлены.

Хромосома 17. Нарушения с вовлечением хромосомы 17 выявлены в 13 случаях (46,1%) (##3, 4, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 24, 26). В трех случаях (##16, 21, 26) обнаружен дополнительный неидентифицируемый хромосомный материал на 17p. Методами FISH выявлены транслокация *t* (17;18) без делеции локуса гена *TP53* (#26), транслокации с делецией локуса гена *TP53* (#16, #21).

Молекулярно-цитогенетическими методами подтверждены транслокация *t* (5;17) с делецией 17p13/TP53 (#3), делеция 17p13/TP53 (#18).

У двенадцати больных выявлена делеция 17p13/TP53, в пяти случаях эта делеция обнаружена методами iFISH и mFISH, и в одном случае только методом iFISH (#24). В случаях #4, #14, #19 методами FISH выявлены сложные транслокации с вовлечением хромосомы 17 с делецией локуса гена *TP53*, не обнаруженные при СЦИ.

При СЦИ моносомия 17 обнаружена в трех случаях (##13, 15, 19). В кариотипе этих больных методами FISH обнаружены хромосома 17 с делецией 17p13/TP53 (#13), транслокации с делецией 17p13/TP53 (##15, 19). Истинная моносомия 17 не подтверждена.

№ случая	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
делеция																										
транслокация																										
истинная моносомия																										
трисомия																										

Рис. 2. Схема, демонстрирующая хромосомные нарушения в кариотипе 26 больных, выявленные в результате сочетания методов СЦИ, FISH, mFISH. Хромосомные нарушения обозначены различными цветами: зеленый – делеции различных хромосом, синий – транслокации с вовлечением различных хромосом, красный – истинные моносомии (фрагменты хромосом не обнаружены), желтый – трисомии.

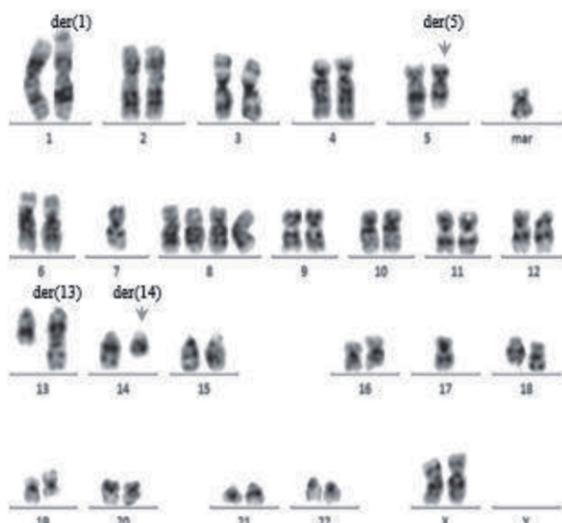
делеция 5q																										
транслокация 5																										
делеция 7q																										
транслокация с 7																										
делеция 17p																										
транслокация с 17																										
истинная моносомия 7																										

Рис. 3. Схема, демонстрирующая нарушения с вовлечением хромосом 5, 7, 17 (n = 23), выявленные методами СЦИ, FISH, mFISH. Хромосомные нарушения обозначены различными цветами: делеция 5q желтым, транслокация с вовлечением хромосомы 5 красным, делеция 7q голубым, транслокация с вовлечением хромосомы 7 синим, делеция 17p зеленым, транслокация с вовлечением хромосомы 17 коричневым, истинная моносомия (фрагменты хромосом не обнаружены) фиолетовым.

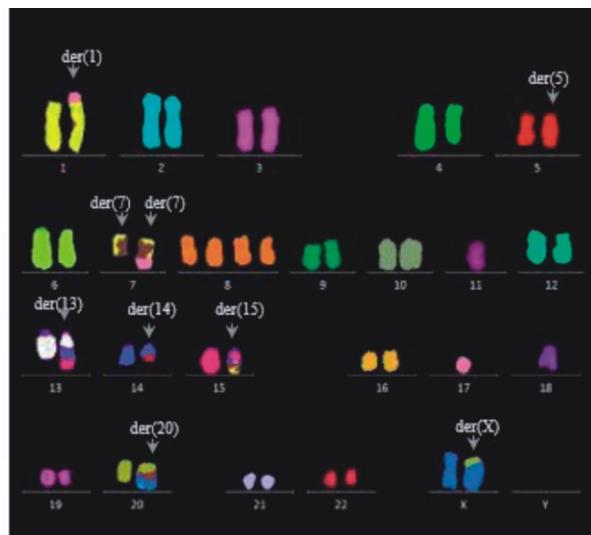
Методами молекулярно-цитогенетического анализа установлено, что маркерные хромосомы, обнаруженные в кариотипах 14 больных (53,8%) образованы в результате транслокаций, транслокаций с делециями, амплификации.

Обсуждение

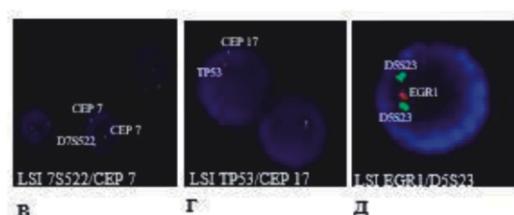
Точная идентификация клональных хромосомных нарушений и определение точек разрывов хромосом в клетках костного мозга больных на момент установления.



а



б



в

г

д

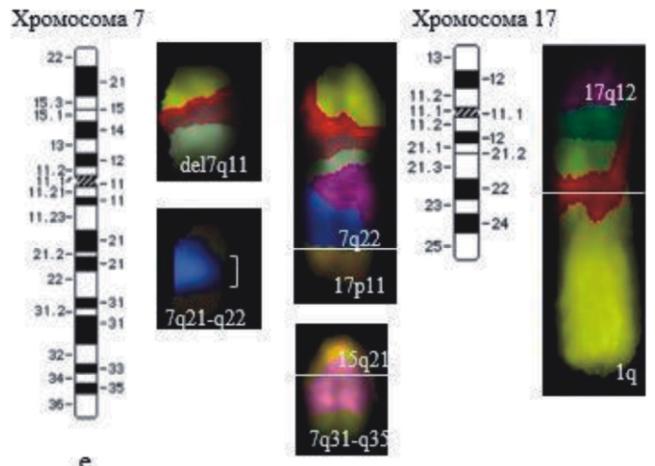


Рис. 4. Случай #4, больная 89 л., МДС.

- а) Кариотип (G-band): 47, XX, der (1) add(p36), del (5) (q15q33), -7, +8x2, der (13) add(q33), -17, +mar [19]/47, XX, idem, der (2)[1];
 б) Кариотип (MFISH) больной #4 (89 л., МДС), выполнено с ДНК зондом 24XCyte (MetaSystems): 47, t(X;7;20), X, t (1;5;7;13;14;15;17;20), del (5) (q31), -8x2, -17[5];
 в) iFISH на интерфазных ядрах с ДНК зондом LSI 7S522/CEP7, выявлена делеция 7q31 (два зеленых сигнала от центромеры хромосомы 7, один красный сигнал от региона 7S522/7q31);
 г) iFISH на интерфазных ядрах с ДНК зондом LSI TP53/CEP17, выявлена моносомия 17 (один зеленый сигнал от центромеры хромосомы 17 и один сигнал от региона 17p13/TP53);
 д) iFISH на интерфазных ядрах с ДНК зондом LSI EGR1/D5S23, выявлена делеция региона 5q31 (два зеленых сигнала от региона 5p15 и один сигнал от региона 5q31/EGR1);
 е) mBAND с ДНК зондами XCye mBAND 7, XCye mBAND 15, XCye mBAND 17 (MetaSystems). Выявлены делеции одного из гомологов хромосомы 7 (del (7) (q11)), регион 7q22 вовлечен в сложную транслокацию t(X;7;20), регион 7q31 делецирован, что подтверждено iFISH. Второй гомолог хромосомы 7 вовлечен в сложную транслокацию с участием шести хромосомных партнеров, точка разрыва расположена ниже 7q22, регион 7q31 сохранен и полностью транслоцирован на хромосому 15 (точка разрыва 15q21). Моносомия 17 не является истинной так как обнаружены регионы хромосомы 17, вовлеченные в сложную транслокацию.

ния диагноза может привести к лучшему пониманию генетических событий, лежащих в основе лейкемогенеза и прогрессии опухоли, а также направлять дальнейшие молекулярные исследования генов, участвующих в патогенезе заболевания. При МДС и ОМЛ хромосомные нарушения являются важнейшими факторами прогноза [4, 5, 17, 18, 19], и в последнее время результаты анализа кариотипа влияют на выбор терапевтической тактики [20, 21].

Самыми частыми и наиболее хорошо изученными в плане прогноза и связи с клиническими и морфологическими особенностями являются аномалии хромосом 5, 7, делеции 11q, 20q, 17p и потеря хромосомы Y. Транслокации не характерны для больных МДС, однако обнаруживаются в кариотипах больных ОМЛ.

Применение молекулярно-цитогенетических методов со значительно более высокой разрешающей способностью, чем СЦИ, позволяет более детально описывать КК [14, 15, 23, 24].

В исследование включено 26 больных МДС и ОМЛ с КК. При СЦИ точно установить хромосомных партнеров, участников несбалансированных хромосомных нарушений и точки разрывов не представлялось возможным. Этим больным были выполнены молекулярно-цитогенетические исследования с использованием методов mFISH, mBAND и iFISH, что позволило идентифицировать количественные и структурные аномалии, уточнить точки разрывов хромосом, и определить прохождение маркерных хромосом.

Чаще встречались аномалии хромосом 5, 7, 11 и 17.

Истинной моносомии хромосом 5 и 17 выявлено не было, только в одном случае моносомия 7 доказана молекулярно-цитогенетическими методами исследования. Во всех остальных случаях были выявлены фрагменты хромосом 5, 7, 17, вовлеченные в транслокации с делециями локусов 5q31, 7q31 и 17p13. В этих регионах находятся потенциальные гены опухолевой супрессии, участвующие в патогенезе МДС и ОМЛ. Потеря функции белка p53 в результате мутации/ делеции гена *TP53* приводит к генетической нестабильности и повышению жизнеспособности опухолевых клеток [25]. В нашем исследовании почти в половине случаев ($n = 12$) выявлена делеция 17p13/*TP53*, в шести случаях из них делеция обнаружена только методами FISH, что указывает на необходимость выполнения этого исследования всем больным с КК.

Делекции и/или транслокации с вовлечением локусаprotoонкогена *MLL*(*KMT2A*)/11q23.3 в нашем исследовании не обнаружено. Амплификация гена *MLL* встречается у больных МДС/ОМЛ в 1% случаев, чаще в старшей возрастной группе, сочетается с КК и крайне неблагоприятным прогнозом заболевания [26, 27, 28]. В нашем исследовании в кариотипе трех больных выявлены дополнительные копии гена *MLL* (до 12 копий), расположенные интрасомально в маркерных хромосомах.

Кроме типичных для МДС и ОМЛ регионов 5q31, 7q31 и 17p13, в структурных перестройках хромосом было задействовано множество других точек разрыва во всех хромосомах. С целью установления неслучайного характера возникновения этих точек разрыва и поиска

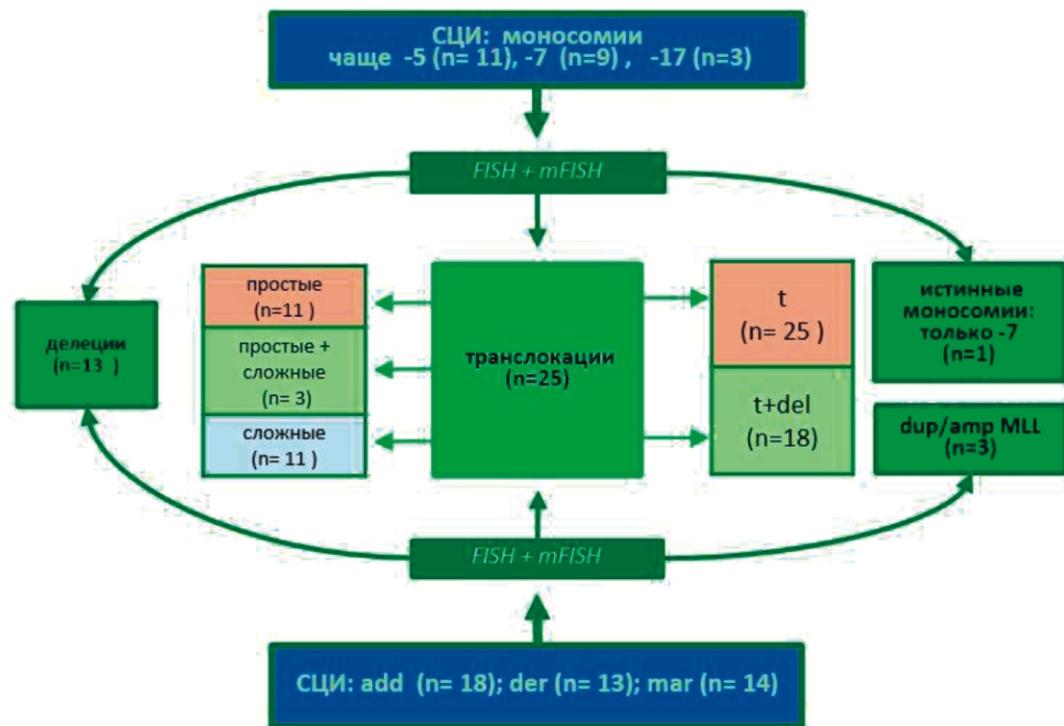


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая результаты исследования КК ($n = 26$): t – транслокация, t+del – транслокация с делецией.

в них потенциальных генов, участвующих в патогенезе МДС и ОМЛ необходимо продолжение исследования большего количества больных с КК.

Список литературы

1. Nybakken G E, Bagg A. The genetic basis and expanding role of molecular analysis in the diagnosis, prognosis, and therapeutic design for myelodysplastic syndromes. *J Mol Diagn.* 2014 Mar;16(2):145-58.
2. Arber D, Orazi A, Hassrjian R. The 2016 revision to the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20).
3. Ahmad F, Dalvi R, Mandava S. Molecular characterization of complex chromosomal rearrangement: First report of novel t(7;12) (q11;q22) as part of a complex karyotype in de novo AML. *Pathol Res Pract.* 2014 Dec;210(12):1090-4. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2014.08.015>.
4. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997 Mar 15;89(6):2079-88.
5. Greenberg P L, Tuechler H, Schanz J Et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454-65. doi: 10.1182/blood-2012-03-420489.
6. Zemanova Z, Michalova K, Buryova H Et al. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leuk Res.* 2014 May;38(5):537-44.
7. Wang S A, Abruzzo L V, Hasserjian R P et al. Myelodysplastic syndromes with deletions of chromosome 11q lack cryptic MLL rearrangement and exhibit characteristic clinicopathologic features. *Leukemia Research* 35 (2011) 351-357.
8. Ferrara F, Schiffer C A. Acute myeloid leukemia in adults. *Lancet.* 2013 Feb 9;381(9865):484-95.
9. Breems D A, Van Putten W L et al. Monosomal Karyotype in Acute Myeloid Leukemia: A Better Indicator of Poor Prognosis Than a Complex Karyotype. *J Clin Oncol.* 2008 Oct 10;26(29):4791-7. doi: 10.1200/JCO.2008.16.0259.
10. Renneville A, Roumier C, Biggio V Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia.* 2008 May;22(5):915-31.
11. Liehr T. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) -Application Guide. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009, p I (16).
12. Pinheiro R F, Chauffaille M L. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42(11):1110-2.
13. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood.* 2013;122(17):2943-64.
14. Speicher M R, Gwyn Ballard S, Ward D C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi- fluor FISH. *Nat Genet.* 1996 Apr;12(4):368-75.
15. Schrock E, du Manoir S, Veldman T et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science.* 1996; 273(5274):494-7.
16. Shaffer L G, McGowan-Jordan J, Schmid M. ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, S. Karger, Basel, Switzerland, 2013.
17. Fenaux P. Myelodysplastic syndromes: from pathogenesis and prognosis to treatment. *Semin Hematol.* 2004 (2 Suppl 4):6-12.
18. Navada S, Chatalbash A, Silverman L. Clinical significance of cytogenetic manifestations in myelodysplastic syndromes. *LabMedicine,* 2013; 44: 103-107.
19. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 2008; 87(7): 515-26. doi: 10.1007/s00277-008-0483-y.
20. List A, Kurtin S, Roe D J Et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2005; 352(6):549-57.
21. Fenaux P, Mufti G J, Hellstrom-Lindberg E et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomized, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009;10(3):223-32.
22. Volkert S, Kohlmann A, Schnittger S et al. Association of the type of 5q loss with complex karyotype, clonal evolution, TP53 mutation status, and prognosis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014 May;53(5):402-10.
23. Tanke H J, Wiegant J, van Gijlswijk RP et al. New strategy for multi-color fluorescence in situ hybridization: COBRA: combined binary ratio labelling. *Eur J Hum Genet.* 1999; 7(1):2-11.
24. Babicka L, Ransdorfova S, Brezinova J et al. Analysis of complex chromosomal rearrangements in adult patients with MDS and AML by multicolor FISH. *Leukemia Research;* 31(2007): 39-47.
25. Mrozek K. Cytogenetic, molecular genetics, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol.* 2008 Aug;35(4):365-77.
26. Andersen M, Christiansen D et al. Duplication or amplification of chromosome band 11q23, including the unarranged MLL gene, is a recurrent abnormality in therapy-related MDS and AML, and is closely related to mutation of the TP53 gene and to previous therapy with alkylating agents. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001; 31(1):33-41.
27. Sarova I, Berezinova J et al. Characterization of Chromosome 11 Breakpoints and the Areas of Deletion and Amplification in Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013; 52:619-635
28. Tang G, DiNardo CD, Zhang L. et al. MLL gene amplification in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes is associated with characteristic clinicopathological findings and TP53 gene mutation. *Hum Pathol* 46(1):65-73, 1/2015. e-Pub 10/2014. PMID: 25387813.