

АНАЛИЗ КОМПЛЕКСНЫХ ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

[Р. В. Тарновский](#)¹, [Т. И. Поспелова](#)¹, [М. А. Зенкова](#)², [С. А. Таирова](#)³

¹ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава
России (г. Новосибирск)

²ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН
(г. Новосибирск)

³ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 2» (г. Новосибирск)

Проведено исследование значимых генетических aberrаций в группе онкогематологических пациентов г. Новосибирска методом анализа на ДНК-микрочипах и оценка их роли в прогнозе заболевания. Полученные данные сопоставлены с эффективностью полихимиотерапии и сформированы прогностические группы. В группе неблагоприятного прогноза чаще встречались множественные генетические aberrации, в отличие от группы пациентов с благоприятным прогнозом заболевания, у которых преимущественно отмечались одиночные генетические aberrации. Геночипирование позволяет одновременно выявлять широкий спектр генетических аномалий для определения прогноза пациентов с острыми лейкозами.

Ключевые слова: ДНК-микрочипы, microarray, биочип, острый лейкоз, хромосомные транслокации, прогноз, гемобластоз, химерные гены, комплексные нарушения кариотипа.

Тарновский Радион Валерьевич — заочный аспирант, ассистент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: tarnovsky-radion@mail.ru

Поспелова Татьяна Ивановна — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ, проректор по научной работе ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 279-94-06

Зенкова Марина Аркадьевна — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии нуклеиновых кислот ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины», e-mail: marzen@niboch.nsc.ru

Таирова Софья Александровна — врач лабораторный генетик
клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница

Актуальность. Заболеваемость гемобластозами составляет в среднем 10 на 100 тыс. населения в год и занимает 6–8-е место среди новообразований, составляя 6–7 % от них. В последние годы средняя заболеваемость опухолями крови в РФ составила 12,9 на 100 тыс. (в некоторых регионах этот показатель превышает 20,0). По данным Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена, в 2013 году в общей структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в РФ гемобласты составляли 4,6 %. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), заболевания кроветворной и лимфоидной тканей составляют около 1 % от всех причин смертности населения. На их долю приходится от 6 до 10 % всех случаев смерти от злокачественных новообразований, а среди пациентов в возрасте до 30 лет — 50 %. При этом по уровню экономического урона, наносимому обществу, опухоли крови в экономически развитых странах занимают 2-е место после рака легкого, являясь наиболее частой причиной смерти в детском и молодом возрасте [1]. Ежегодно регистрируется 2700 человек (14 %), заболевших острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ), острым миелобластными лейкозами (ОМЛ) 1600 (9 %), другими острыми лейкозами — 1000 (5,0 %) [2].

В основе развития острых лейкозов лежат генетические изменения в клетке — предшественнице гемопоэза. Эти изменения представляют собой хромосомные aberrации и генные мутации. Постановка диагноза острый лейкоз сегодня невозможна без проведения цитогенетического исследования и привлечения современных методов молекулярной биологии.

Микрочиповые (*eng.*, microarray, далее по тексту — микрочипы или геночипирование) технологии (например, ДНК-чипы) находят сегодня все большее применение в различных областях практической медицины. Так, в онкогематологии данный метод позволяет одномоментно выявлять широкий спектр клинически значимых генетических аномалий для определения прогноза и тактики лечения пациентов с гемобластомами (см. табл.).

В соответствии с классификацией ВОЗ опухолей кроветворной и лимфоидной тканей, для определения варианта острого лейкоза необходимо учитывать не только результаты цитологического и цитохимического исследований, но и результаты иммуноцитохимического, цитогенетического или молекулярно-генетического методов исследования, важность проведения которых обусловлена как более точной диагностикой конкретной нозологической формы, так и влиянием выявляемых цитогенетических аномалий на прогноз заболевания [3].

Самым известным и повсеместно распространенным методом цитогенетического исследования является G-дифференциальная окраска хромосом, позволяющая полностью описать кариотип и обнаружить маркерные и варианты перестройки генома. Однако, несмотря на универсальность, недостатком данного метода является его низкая чувствительность 1:100 ввиду ограниченности количества метафаз, необходимых для верификации хромосомных aberrаций.

В отличие от классического цитогенетического метода исследования, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH-метод) — это молекулярно-генетический метод, позволяющий выявить присутствие, количество и точную локализацию определенной, заранее известной последовательности ДНК в ограниченном количестве клеточного субстрата.

К сожалению, применение FISH имеет ряд ограничений, связанных с достаточно высокой стоимостью зондов и возможностью определения только одной заранее известной мутации [4].

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) обладает высокой чувствительностью (одна клетка на 10 000 клеток) и специфичностью, что позволяет использовать его в диагностике минимальной остаточной болезни при оценке эффективности противоопухолевой терапии, но он неудобен для одновременного определения большого числа мутаций различных генов у одного пациента.

К общим недостаткам данных методов можно отнести трудоемкость, высокую себестоимость и длительность проводимого исследования, а значит и постановки диагноза (от 3-х до 5-ти дней).

ДНК-микрочипы могут помочь обеспечить целостный взгляд на изменения в структуре экспрессии генов. Данный метод позволяет анализировать дифференциальную экспрессию десятков и тысяч генов одновременно. Биочип в современном понимании — это матрица с нанесёнными молекулами белков, нуклеиновых кислот, биомакромолекул или биоструктур для одновременного проведения большого числа анализов в одном образце. В основе механизма действия биочипов лежит молекулярное распознавание анализируемых молекул биополимерами, нанесёнными на чип. Это распознавание построено либо на взаимодействии рецепторов с лигандами (например, антител с антигенами), либо на гибридизации комплементарных цепей ДНК [4–6]. В частности, разработаны биочипы, распознающие определенные последовательности ДНК или РНК и позволяющие детектировать единичные мутации в генах или в продуктах транскрипции генов — мРНК. Длина и последовательность олигонуклеотидов, нанесённых (иммобилизованных) на микрочип, является одним из ключевых факторов, определяющих их высокую эффективность и специфичность. При нанесении на микрочип анализируемого образца, который представляет собой ПЦР-продукт, полученный с использованием РНК, выделенной из клеток крови или костного мозга пациентов, таргетная ДНК в образце формирует дуплекс с комплементарным(и) ей олигонуклеотидом(и) на чипе. В результате генерируется сигнал, свидетельствующий о наличии в пробе соответствующего объекта, а именно, ДНК определенной последовательности.

Исследование мутационного статуса с помощью ДНК-микрочипов имеет ряд преимуществ перед используемыми в настоящее время методами — это возможность одномоментного исследования большого количества искомым мутаций в короткий промежуток времени [7].

В Российской Федерации на сегодняшний день, в отличие от стандартной цитогенетики, в диагностике острых лейкозов молекулярно-генетические исследования в целом и микрочиповые технологии, в частности, не являются обязательным методом исследования. Внедрение в широкую медицинскую практику технологий, основанных на использовании ДНК-микрочипов, позволит улучшить точность первичной диагностики и определения как варианта заболевания, так и группы прогноза, а значит, и адекватной терапевтической тактики [8–10].

Цель исследования: с помощью метода геночипирования (microarray-анализ) определить характерные профили экспрессии химерных генов у больных острыми миело- и лимфолейкозами и оценить их роль в прогнозе заболевания.

Материал и методы. На базе Городского гематологического центра г. Новосибирска

обследовано 47 пациентов с острыми лейкозами: 38 больных с ОМЛ, 9 пациентов с ОЛЛ. Средний возраст больных составил $48 \pm 26,3$ года. Все пациенты с впервые выявленным заболеванием были разделены на 2 прогностические группы. На сегодняшний день в стратификации групп риска ОМЛ и ОЛЛ существуют различные подходы.

В данном исследовании мы формировали группы прогноза, руководствуясь независимыми прогностическими факторами [10].

Критериями включения в группу неблагоприятного прогноза были возраст (для ОМЛ старше 60 лет, для ОЛЛ старше 15 лет), наличие нейрорлейкемии (для ОЛЛ), гиперлейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$). В группу с благоприятным прогнозом вошли 18 человек (38,3 %), с неблагоприятным прогнозом — 29 человек (61,7 %). В обеих группах с помощью метода геночипирования проведен анализ 96-ти образцов РНК костного мозга и периферической крови. Использовались тест-системы (матричные молекулярные биочипы) «ЛК-БИОЧИП», Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта. На поверхности биочипов были иммобилизованы олигонуклеотиды, комплементарные участкам последовательностей матричной РНК, химерных генов AML/ETO, E2A/PBX, BCR/ABL, PML/RARA, CBFB/MYH11, TEL/AML, MLL (общий), появляющиеся как результат хромосомных транслокаций t(8;21), t(1;19), t(9;22), t(15;17), inv16, t(12;21).

Выбор данного спектра из 13-ти генетических aberrаций обусловлен их клинической и прогностической значимостью при острых лейкозах (см. табл.) Наличие комплексных изменений кариотипа (2-х и более транслокаций) также принято относить к факторам неблагоприятного прогноза.

Профиль выявляемых с помощью ДНК-микрочипов хромосомных транслокаций и их прогностическая значимость

Хромосомные транслокации	Генетические aberrации	Прогноз при ОЛ	Существующие подходы в лечении
t(9;22), филадельфийская хромосома	p190 и p210 BCR/ABL	Неблагоприятный	Специфическая терапия ингибиторами тирозинкиназ
Транслокации, затрагивающие 11-ю хромосому	(MLL общий): MLL/AF4, MLL/AF6, MLL/AF9, MLL/AF10, MLL/ENL, MLL/ELL	Неблагоприятный	Как альтернатива может быть предложена аллогенная трансплантация костного мозга
t(8;21)	AML/ETO	Благоприятный	Программная полихимиотерапия
t(12;21)	TEL/AML1	Благоприятный	Программная полихимиотерапия
t(1;19)	E2A/PBX	Промежуточный	Возможны интенсификация курсов полихимиотерапии или аллогенная трансплантация костного мозга.
t(16;16)	CBFB/MYH11	Благоприятный	Программная полихимиотерапия
t(15;17)	PML/RARa	Благоприятный	Лечение полностью трансретиноевой кислотой (ATRA)

Полученные данные об экспрессии указанных генов сопоставляли с эффективностью программной полихимиотерапии и прогнозом заболевания.

Результаты исследования. Анализ мутационного статуса в клетках костного мозга и периферической крови больных ОЛЛ выявил изменения в обеих группах: в группе

неблагоприятного прогноза — у 20-ти больных, что составило 42,5 %, в группе с благоприятным прогнозом мутации выявлены в меньшем числе случаев — у 9-ти пациентов (19,1 %). В группе благоприятного прогноза наиболее часто встречались одиночные хромосомные aberrации, приводящие к повышенной экспрессии химерных генов — AML/ETO (у 8-ми пациентов с ОМЛ) и MLL (у 1-го пациента с ОЛЛ). У 8-ми (88 %) пациентов этой группы получена полная ремиссия на фоне проводимой индукционной полихимохимиотерапии.

В группе пациентов с неблагоприятным прогнозом заболевания отмечено наличие комплексных aberrаций с частотой 22,5 % (10 чел.), причем в 2-х случаях наблюдалась одновременная экспрессия MLL, TEL/AML, в 3-х случаях — CBFB/MYH11, AML/ETO, у 2-х пациентов наблюдалась одновременная экспрессия 3-х химерных генов: MLL, AML/ETO, BCR/ABL и MLL, AML/ETO, TEL/AML соответственно. Одиночные хромосомные aberrации (наиболее часто ген AML/ETO) отмечены у 10-ти больных (34 %) с ОМЛ. Также в группе неблагоприятного прогноза у 16-ти (80 %) больных удалось добиться полной клинико-гематологической ремиссии на фоне проводимой химиотерапии.

Выводы. У больных острыми лейкозами с неблагоприятным течением заболевания и рефрактерностью к проводимой терапии встречаются множественные (2 и более) генетические aberrации с наиболее частым профилем аномальных генов: MLL, AML/ETO, BCR/ABL и MLL, AML/ETO и TEL/AML, в отличие от пациентов группы с благоприятным прогнозом заболевания, у которых были отмечены только одиночные генетические aberrации. В международной практике группы риска пациентов с острым лейкозом в настоящее время формируются на основе выявляемых цитогенетических и молекулярно-генетических нарушений (рекомендации Американского общества клинических онкологов и Европейской кооперативной группы Leukemia Net, IEP (International Expert Panel)).

Использование метода геночипирования позволяет одновременно выявлять широкий спектр клинически значимых генетических аномалий, в том числе и комплексные нарушения кариотипа для определения прогноза и тактики лечения пациентов с острыми лейкозами.

Список литературы

1. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой — М. : МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2015.
2. Клиническая онкогематология : руководство для врачей / Под ред. М. А. Волковой. — 2-е изд. — М. : Медицина, 2007.
3. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue / S. Swerdlow [et al.]. — 4th edition. — World Health Organization. — October 2008.
4. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling / E. J. Yeoh [et al.] // Cancer Cell. — 2002. — Vol. 1 (2). — P. 133-43.
5. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma / A. Rosenwald [et al.] // Cancer Cell. — 2003. — Vol. 3 (2). — P. 185-97.
6. Мирзабеков А. Д. Биочипы в биологии и медицине XXI века. Выступление на научной сессии общего собрания РАН / А. Д. Мирзабеков // Вестн. РАН. — 2003. — Т. 73, вып. 5. — С. 412.

7. Метод биочипов (microarray) в диагностике хромосомных aberrаций у больных гемобластозами / И. Б. Ковынев [и др.] // Гематология и трансфузиология. — 2012. — Т. 57, № 3 (приложение). — С. 52-53.
8. Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia (AML) / U. Bacher [et al.] // Best Pract. Res. Clin. Haematol. — 2009. — Vol. 22. — P. 169-180.
9. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia : report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group / T. Haferlach [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2010. — Vol. 28. — P. 2529-2537.
10. Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction / C. S. Wilson [et al.] // Blood. — 2006. — Vol. 108. — P. 685-696.
11. Гематология : национальное руководство / Под ред. О. А. Рукавицина. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. — С. 180-199.

ANALYSIS OF COMPLEX CHROMOSOMAL DISTURBANCES IN GROUP OF PATIENTS WITH ACUTE LEUKOSIS

R. V. Tarnovskiy¹, T. I. Pospelova¹, M. A. Zenkova², C. A. Tairova³

¹*SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University» of Ministry of Health (Novosibirsk)*

²*FSBHE «Institute of chemical biology and fundamental medicine of the SB RAS» (Novosibirsk)*

³*SBHE NR «City clinical hospital № 2» (Novosibirsk)*

Research of significant genetic aberrations in group of oncohematological patients in Novosibirsk by analysis method on DNA microchips and assessment of their role in the prognosis for a disease is conducted. The obtained data are compared with efficiency of polychemotherapy and prognostic groups are created. In group of the adverse prognosis the multiple genetic aberrations took place more often, unlike the group of patients with the favorable forecast of disease at who had mainly single genetic aberrations. Implanting of genetic chips allows to reveal wide range of genetic anomalies for single-step definition of the forecast of patients with acute leukemia.

Keywords: DNA microchips, microarray, biochip, acute leukemia, chromosomal translocations, forecast and prognosis, hemoblastosis, chimeric genes, complex disturbances of karyotype.

About authors:

Tarnovskiy Radion Valeryevich — correspondence post-graduate student, assistant of therapy, hematology and transfusiology chair of FAT & PDD at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University» of Ministry of Health, e-mail: tarnovsky-radion@mail.ru

Pospelova Tatyana Ivanovna — doctor of medical science, professor, head of therapy, hematology and transfusiology chair of FAT & PDD at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University» of Ministry of Health, office phone: 8 (383) 279-94-06

Zenkova Marina Arkadyevna — doctor of biological science, professor, head of laboratory of nucleic acids biochemistry at FSBHE «Institute of chemical biology and fundamental medicine of the SB RAS», e-mail: marzen@niboch.nsc.ru

Tairova Sofya Aleksandrovna — laboratory geneticist of clinicodiagnostic laboratory at SBHE NR «City clinical hospital № 2», e-mail: tarnovsky-radion@mail.ru

List of the Literature:

1. Malignant neoplasms in Russia in 2013 (case rate and mortality) / Under the editorship of A. D. Kaprin, V. V. Starinsky, G. V. Petrova — M.: MSIOC n. a. P. A. Herzen, branch of FSBE"FMRI n. a. P. A. Herzen" of the Russian Ministry of Health, 2015.
2. Clinical haemato-oncology: guidance for doctors / Under the editorship of M. A. Volkova. — 2nd ed. — M.: Medicine, 2007.
3. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue / S. Swerdlow

- [et al.]. — 4th edition. — World Health Organization. — October 2008.
4. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling / E. J. Yeoh [et al.] // *Cancer Cell*. — 2002. — Vol. 1 (2). — P. 133-43.
 5. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma / A. Rosenwald [et al.] // *Cancer Cell*. — 2003. — Vol. 3 (2). — P. 185-97.
 6. Mirzabekov A. D. Biochipy in biology and medicine of the XXI century. Performance at scientific session of general meeting of the Russian Academy of Sciences / A. D. Mirzabekov // *Bulletin of Russian Academy of Sciences*. — 2003. — V. 73, iss. 5. — P. 412.
 7. Method of biochips (microarray) in diagnostics of chromosomal aberrations at patients with hemoblastoses / I. B. Kovynev [etc.] // *Hematology and transfusiology*. — 2012. — V. 57, N 3 (appendix). — P. 52-53.
 8. Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia (AML) / U. Bacher [et al.] // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* — 2009. — Vol. 22. — P. 169-180.
 9. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia : report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group / T. Haferlach [et al.] // *J. Clin. Oncol.* — 2010. — Vol. 28. — P. 2529-2537.
 10. Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction / C. S. Wilson [et al.] // *Blood*. — 2006. — Vol. 108. — P. 685-696.
 11. Hematology: national guidance / Under the editorship of O. A. Rukavitsin. — M.: GEOTAR-media, 2015. — Page 180-199.