

УДК 616.155.392-036.11-092-07

А. С. МКРТЧЯՆ

## СКРИНИНГОВОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ АБЕРРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ МЕТОДОМ FISH В ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТКАХ

Изучены количественные aberrации у 19 больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) с применением метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) в интерфазных клетках. На кафедре генетики и цитологии ЕГУ были созданы центромерные ДНК-зонды для 8, 10, 11, 7, X и Y хромосом. У 10 больных были обнаружены разные количественные aberrации (не менее 3%) тестируемых хромосом. Из них у одного пациента была выявлена близкотетраплоидия. Метод FISH в интерфазных клетках позволил обнаружить цитогенетические нарушения у больных ОМЛ при невозможности классического хромосомного анализа и рекомендован нами для скринингового применения.

**Введение.** Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой клональную экспансию миелобластов в костном мозге, периферической крови или других тканях [1]. Большинство больных ОМЛ имеет цитогенетические нарушения, многие из которых ассоциированы со специфическими морфологическими и клиническими признаками болезни. Первичные и вторичные хромосомные изменения в blastах при ОМЛ имеют неслучайную природу и патогенетически важны как при классификации, так и при прогнозе болезни [2]. Цитогенетические исследования больных ОМЛ в некоторых случаях затруднены из-за невозможности получения достаточного количества метафаз хорошего качества [3]. Появление новых технологий молекулярной цитогенетики, базирующихся преимущественно на *in situ* гибридизации нуклеиновых кислот, значительно расширило возможности генетической диагностики. Метод FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) – это технология непосредственной визуализации участков генов на хромосомах и интерфазных ядрах [4]. Однако применение метода FISH не всегда доступно из-за высокой стоимости коммерческих ДНК-зондов. Развитие собственной библиотеки ДНК-зондов, включающих разные участки хромосом, важные при той или иной патологии, предоставляет возможность широкого и целенаправленного применения этого метода [5]. Использование комбинаций разных центромерных зондов для выявления количественных хромосомных aberrаций позволяет изучить большое число клеток путем подсчета сигналов в каждом ядре [4].

Целью представленной работы было создание центромерных ДНК-зондов некоторых хромосом и изучение методом интерфазной FISH количественных изменений этих хромосом у 19 больных ОМЛ, у которых отсутствовал цитогенетический диагноз.

**Материалы и методы.** Нами были изучены культивированные клетки костного мозга или периферической крови 19 больных ОМЛ (Центр гематологии и переливания крови МЗ РА). Среди них было 9 мужчин и 10 женщин.

**Культивирование и приготовление препаратов.** Клетки костного мозга и крови больных культивировались в среде RPMI 1640 с L-глутамином (*Sigma*, США) и 15% эмбриональной телячьей сыворотки (*BioMedia*, Малазия) в пластиковых матрацах (*Cellstar*®, США). Клетки костного мозга культивировались 24 часа, а клетки периферической крови – 48 часов в термостате при 37°C. Для остановки деления клеток в митозе использовался колцемид с конечной концентрацией 0,1 мг/мл в последние два часа культивации. Гипотонический шок, фиксация клеток, приготовление цитогенетических препаратов проводились по стандартной методике [6].

**Приготовление ДНК-зондов и FISH.** Центромер-специфичные ДНК-зонды были получены мечением определенной последовательности в ДНК человека методом Ник-трансляции. Источниками специфичных отрезков ДНК человека с  $\alpha$ -сателлитными участками каждой хромосомы были трансгенные *E. coli* бактерии, содержащие векторы Alpha-7, pZ7,5; Alpha-8, pZ8,4; Alpha-10, pZ10-1,3; Alpha-11, pRB11; Alpha-X и Alpha-Y, полученные из университета Бари, Италия. После экстракции плазмидная ДНК была мечена набором DIG (Digoxigenin)-Ник-трансляции (*Roche*, Германия) согласно инструкции. Повторяющиеся последовательности полученных зондов были блокированы добавлением соответствующего количества ДНК, содержащих повторные участки (Human Cot-1 DNA (*Sigma*, США) и Human Fragmented Placenta DNA (*Sigma*, США)), далее ДНК-зонды осаждались и растворялись в гибридизационном буфере (*Hybrisol VI, Appligene Oncor*, США).

Цитогенетические препараты были обработаны в растворе 0,005% пепсина (*Sigma*, США) с 0,01N HCl на водяной бане при 37°C 15 мин. Далее хромосомы были зафиксированы в 1% растворе формальдегида в фосфатном буфере (pH=7,4) при комнатной температуре в течение 5 мин. Для дегидратации они содержались в 70, 85, 100%-ом растворах этанола по 5 мин.

ДНК-зонды были нанесены на предварительно обработанные препараты. После денатурации на горячей поверхности при 73°C препараты инкубировались во влажной камере при 37°C 12–16 ч. После гибридизации препараты промывались в растворах с детергентом 0,4XSSC/0,3%IGEPAL, pH=7,0, при 73°C 2 мин, а затем – в 2XSSC/0,1%IGEPAL, pH=7,0, при комнатной температуре 20 секунд.

Для выявления DIG-меченного ДНК-зонда в качестве флуорохрома использовался родамин (AntiDIG-Rhodamine, *Roche*, Германия), флуоресцирующий красный цвет. Для визуализации ядер и метафаз препараты окрашивались раствором диаминофенилизодида (DAPI/Antifade, *Sigma*, США) с конечной концентрацией 0,1 мг/мл. Препараты анализировались под флуоресцентным микроскопом (*Zeiss*, Германия) с использованием программы ISIS

(MetaSystem, Германия). Для каждого зонда исследовали более 100 интерфазных ядер, и эксперимент был повторен на препаратах со слабыми сигналами зонда.

**Результаты и обсуждение.** В представленной работе были исследованы количественные aberrации 7, 8, 10, 11, X и Y хромосом методом интерфазной FISH у 19 больных ОМЛ, у которых отсутствовал цитогенетический диагноз. Полученные результаты о количественных аномалиях для каждого больного представлены в таблице. Существуют разные мнения по поводу учета низкого процента таких аномалий при диагностике FISH как достоверных данных [7]. Однако во избежание ложных данных нами учитывались больные с количеством aberrантных клеток не меньше 3% [8].

У 10 больных из 19 наши исследования обнаружили разные количественные aberrации по тестируемым хромосомам.

У больного под номером 2 были выявлены трисомии и тетрасомии всех тестируемых хромосом в разном количественном соотношении, в ядрах – дополнительная Y хромосома (81,70%) и дополнительная X хромосома (82%). Можно предположить, что у данного больного наблюдается близкотетраплоидия, которая очень редко встречается при ОМЛ (обычно у пожилых мужчин) и имеет плохой прогноз [9, 10].

У 5 больных наблюдалось одновременное присутствие численных аномалий по нескольким хромосомам, что свидетельствует о прогрессии болезни [2, 6]. В наших исследованиях обнаруженные моносомии 7, 10, 11 сопровождалась двумя-тремя другими aberrациями каждая.

Моносомия 7 была определена в трех случаях, моносомия 8 – у 4 больных, трисомия 8 – у двух больных (без учета большого 2 с множественными три- и тетрасомиями), моносомия 10 выявлена у 3 больных, в 3 случаях обнаружена моносомия 11. Потеря Y хромосомы была выявлена в 3 случаях. Потеря X хромосомы не была обнаружена.

Потеря или добавление целой хромосомы нередко встречается при ОМЛ как единичное изменение и как дополнительная aberrация [11]. В ряде исследований показано вовлечение 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 19, 21 и 22 хромосом в количественные аномалии [2, 6]. Потеря X хромосомы как одиночная аномалия встречается очень редко. Потеря Y хромосомы наблюдается чаще при всех миелоидных неоплазиях [1], обычно это изменение встречается у пожилых мужчин и не имеет патогенетического значения [2, 11]. Некоторые количественные aberrации ассоциированы со специфическими структурными aberrациями, подгруппой ОМЛ и имеют важное прогностическое значение [12]. В частности моносомия 7 обычно относится к неблагоприятным цитогенетическим изменениям [2, 13, 14].

Только в одном случае моносомия 11 хромосомы не сопровождалась потерями других тестируемых хромосом и также может ассоциироваться с неблагоприятным прогнозом [15].

Согласно литературным данным, выживаемость больных с трисомией 8 как единичной аномалией не отличается значительно от выживаемости больных с нормальным кариотипом, в то время как больные с трисомией 8,

Результаты исследований количественных aberrаций у больных острым миелоидным лейкозом методом FISH

№ больного	Пол, возраст	Исследуемая ткань	Количество aberrантных клеток в процентах											
			+8 (++8)	-8	+10 (++10)	-10	+11 (++11)	-11	+7 (++7)	-7	-X (+X)	-Y (+Y)		
1	М/25	КМ	0	3,70	30,33							4,46		
2	М/49	КМ	49,21 (22,22)	0	20 (54)	0	9,40 (87,18)	0	37,50 (28,48)	0	0	0	0	0
3	Ж/39	КМ	2,27	1,70	-	1,83	1,46	23,36	0	0	0	0	0	0
4	Ж/60	ПК	1,02	1,37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	М/17	КМ	1,71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Ж/26	ПК	0,92	0	-	3,48	0,88	7,89	1,54	7,69	0	0	0	0
7	М/24	ПК	3,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Ж/20	КМ	0	0	0	0	0,99	0	0	0	0	0	0	0
9	Ж/25	ПК	0	4,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	М/61	ПК	1,37	0	0	13,04	0	3,51	4,03	16,77	0	0	0	11,76
11	Ж/57	ПК	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	М/58	ПК	0,84	6,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	М/63	КМ	0	24,49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,00
14	Ж/68	КМ	0	0	2,67	0	0	2,40	0	0	0	0	0	0
15	М/20	КМ	1,16	1,16	0	0	0	0	0	0	0	0,79	0	0
16	Ж/62	КМ	2,24	0,32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	Ж/50	КМ	1,64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	Ж/25	ПК	30,43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	М/67	ПК	0,91	2,72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Ж – женский, М – мужской, ПК – периферическая кровь, КМ – костный мозг; знаками +, – и ++ обозначены трисомия, моносомия и тетрасомия аутосомных хромосом соответственно, +X, +Y – добавление, -X, -Y – потеря хромосом.  
Жирным шрифтом отмечены больные с количеством aberrантных клеток не меньше 3%.

ассоциированной с другими неблагоприятными цитогенетическими абберациями, имеют плохой прогноз [16, 17].

Таким образом, изучение численных аномалий методом интерфазной FISH позволило выявить некоторые цитогенетические изменения у больных, имеющие важное значение для прогноза ОМЛ. Создание и применение собственной библиотеки ДНК-зондов расширили возможности целенаправленного исследования цитогенетических нарушений у больных ОМЛ. Нами рекомендуется скрининговое использование метода интерфазной FISH для изучения цитогенетических нарушений у больных ОМЛ при невозможности классического хромосомного анализа. С этой целью планируется обогащение библиотеки ДНК-зондов и создание многоцветных локус-специфичных ДНК-зондов для выявления структурных аббераций.

*Кафедра генетики и цитологии*

*Поступила 29.10.2004*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues IARC. Lyon, 2001.
2. Heim S., Mitelman F. Cancer Cytogenetics. 2-nd ed., New York: Wiley-Liss, 1995.
3. Fröhling S., Skelin S., Liebisch C., Scholl C., Schlenk R.F., Döhner H., Döhner K. – Journal of Clinical Oncology, 2002, v. 20, issue 10 (May), p. 2480–2485.
4. Rautenstrauss B., Liehr T. FISH technology. Springer. Lab Manual, 2002.
5. Arutyunyan R., Kasakyan S., Mkrtchyan H., Hovhannisyan A., Manvelyan M., Muradyan A. – Exp. oncol., 2003, v. 25, № 4, p. 307–309.
6. Rooney D.E. Human Cytogenetics malignancy and acquired abnormalities. 3-rd ed., New York: Oxford University Press, 2001.
7. Jenkins R.B., Le Beau M.M., Kraker W.J. et al. – Blood, 1992, v. 79, p. 3307–3315.
8. Cuneo A., Bigoni R., Roberti M. et al. – Haematologica, 1998, v. 83, p. 21–26.
9. Renuka V. Iyer. Massiv hyperploidy and tetraploidy in acute myeloid leukemia. ASCO Annual Meeting, 2002.
10. Estey E.H., Keating M.J., Dixon D.O., Trujillo J.M., McCredie K.B. & Freireich E.J. – Hematol. Pathol., 1987, № 1, p. 203–208.
11. Barch M.J., Knutsen T., Spurbeck J. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. 3-rd ed., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.
12. Neben K., Giesecke C., Schweizer S., Ho A.D., Krämer A. – Blood, 2003, v. 101, № 1, p. 289–291.
13. Yeh S.P., Wang Y., Su J., Hsueh E., Yu M., Wu H.Ti. – Ann Hematol, 2000, Jan., v. 79, № 1, p. 36–39.
14. Keating M.J., Cork A., Broach Y., Smith T., Walters R.S., McCredie K.B., Trujillo J. & Freireich E.J. – Leuk. Res., 1987, № 11, p. 119–133.
15. Salamantchouk Z.YA., Masliak Z.V., Lozynska M.R., Mazurok A.A., Rehtman G.B., Lohinskyj V.O. – Acta Medica Leopoliensia, 1997, № 3–4.
16. Wolfman S.R., Gundacker H., Appelbaum F.R. and Marilyn L. – Blood, 2002, v. 100, № 1, p. 29–35.
17. Giles F.J., Keating A., Goldstone A.H., Avivi I., Willman Ch.L. and Kantarjian H.M. – Hematology, 2002, № 1, p. 73–110.

ՍՈՒՐ ԼԵՅԿՈՋՈՎ ՀԻՎԱՆԴՆԵՐԻ ՈՐՈՇ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ  
ԽԱԹԱՐՈՒՄՆԵՐԻ ՍԿՐԻՆԻՆԳԱՅԻՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ  
ԻՆՏԵՐՖԱԶԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ FISH ՄԵԹՈՂՈՎ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել են սուր միելոիդային լեյկոզով (ՍՄԼ) 19 հիվանդների քանակական խաթարումները ինտերֆազային բջիջներում ֆլուորեսցենտ *in situ* հիբրիդիզացիայի (FISH) մեթոդով: ԵՊՀ-ի գենետիկայի և բջջաբանության ամբիոնում ստեղծվել են ցենտրոմերային ԴՆԹ զոնդեր 8, 10, 11, 7, X և Y քրոմոսոմների համար: 10 հիվանդների բջիջներում հայտնաբերվել են նշված քրոմոսոմների տարբեր քանակական արերացիաներ (ոչ պակաս, քան 3%): Մեկ հիվանդի դեպքում բացահայտվել է մոտոտերապիդիա: FISH մեթոդը ինտերֆազային կորիզներում թույլ տվեց ՍՄԼ-ով հիվանդների բջիջներում հայտնաբերել բջջագենետիկական խաթարումներ այն դեպքերում, երբ դասական քրոմոսոմային անալիզը անհնար էր: Այն առաջարկվում է մեր կողմից սկրինինգային կիրառման համար:

H. S. MKRTCHYAN

SCREENING INVESTIGATION OF SOME NUMERICAL ABERRATIONS  
AT PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA BY FISH METHOD  
IN INTERPHASE CELLS

Summary

Numerical aberrations of 19 patients with acute myeloid leukemia have been studied by the technique of Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in interphase cells. The centromere specific DNA probes for chromosomes 8, 10, 11, 7, X and Y were prepared in the Department of Genetics and Cytology of YSU. We revealed different numerical aberrations of tested chromosomes (not less than 3%) at 10 patients. Near-tetraploidy was found at one of them. FISH method in interphase cells allowed to reveal cytogenetic abnormalities at patients with AML, as the conventional cytogenetic analysis is inaccessible, and screening application is recommended by us.