

## ОСОБЕННОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ ЛИМФОБЛАСТНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

Псеуш С.Ю.<sup>1</sup>, Зозуля Л.В.<sup>1</sup>, Михалева Л.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар;

<sup>2</sup> ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, e-mail: pseush-saida@mail.ru

Острые лимфобластные лейкозы, составляющие около 50% всех онкопатологий у педиатрических пациентов, характеризуются высокой гетерогенностью, обусловленной, во многом, молекулярно-генетическими аномалиями у больных. Диагностика генетических изменений осуществляется с помощью трех основных методов: стандартного кариотипирования, флуоресцентной гибридизации *in situ* и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. В связи с различной чувствительностью и специфичностью данных методов диагностики актуальным представляется изучение особенностей выявления молекулярно-генетических перестроек у детей с острыми лимфобластными лейкозами с помощью различных методов для оценки их эффективности. По результатам исследования 155 больных детей молекулярно-генетические аномалии детектировались у 52,2%. Наиболее распространенными генетическими перестройками стали: t(12;21)/ETV/RUNX1, гипердиплоидный клон с трисомией 4, 10, 17 хромосом, перестройки генов TCF3/PBX1 и MLL. При этом наибольшее количество молекулярно-генетических аномалий обнаружено с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*, результаты которой в 27 случаях не подтвердились при кариотипировании. В то же время в 17 случаях имели место аномалии, выявленные при цитогенетическом исследовании и не подтвердившиеся методом флуоресцентной гибридизации *in situ*. Таким образом, наиболее оптимальным представляется комплексное использование молекулярно-генетических и цитогенетических методов для обнаружения хромосомных aberrаций у детей с острыми лимфобластными лейкозами.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, дети, флуоресцентная гибридизация *in situ*, стандартное кариотипирование, молекулярно-генетическая аномалия.

## FEATURES OF DETECTING CYTOGENETIC AND MOLECULAR-GENETIC ABNORMALITY IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA USING VARIOUS METHODS

Pseush S.Y.<sup>1</sup>, Zozulya L.V.<sup>1</sup>, Mickhaleva L.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FGBU VO «Kuban State University», Krasnodar;

<sup>2</sup>Children's Regional Clinical Hospital, Ministry of Health of Krasnodar Region, Krasnodar, e-mail: pseush-saida@mail.ru

Acute lymphoblastic leukemia, which constitutes around 50% of all oncopathologies in pediatric patients, characterized by high heterogeneity, largely caused by molecular genetic abnormalities in patients. Diagnosis of genetic changes is done with the help of three basic methods: standard karyotyping, fluorescent *in situ* hybridization and polymerase chain reaction with reverse transcription. In connection with the different sensitivities and specifics of the giving methods it is relevant to study the features of detecting molecular genetic rearrangements in children with acute lymphoblastic leukemia with the assistants of different methods for grading the effectiveness. According to the results of the study of the investigation of 155 sick children, molecular genetic abnormalities were detected in 52.2%. The most commonly found genetic rearrangements were: t (12; 21) / ETV / RUNX1, a hyperdiploid clone with trisomy 4, 10, 17 chromosomes, rearrangements of the TCF3 / PBX1 and MLL genes. The highest number of molecular genetic abnormalities was detected using fluorescent *in situ* hybridization, the results of which in 27 cases were not confirmed by karyotyping. While in 17 cases with abnormalities were identified by cytogenetic study, and not confirmed by the method of fluorescence *in situ* hybridization. Therefore, a diagnosis is achieved optimally with the combine use of molecular genetics and cytogenetic methods for the identifying of chromosomal aberrations in children with acute lymphoblastic leukemia.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, children, fluorescence *in situ* hybridization, standard karyotyping, molecular genetic abnormality.

распространенным формам злокачественных новообразований среди детей. Такие патологии составляют около 50% всех случаев онкологических заболеваний детского возраста, большая часть из которых представлена острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ) (80–90%) [1]. В связи с высокой гетерогенностью данной онкопатологии большую роль в диагностике, классификации и прогнозе течения заболевания играет выявление молекулярно-генетических аномалий у больных. Известно, что в 80% случаев развитие как острых лимфобластных, так и острых миелобластных лейкозов ассоциировано с различными хромосомными аномалиями, причем для ОЛЛ часто отмечаются различия в aberrациях у детей разных возрастных групп [2]. Исследователи в основном выделяют две группы пациентов по хромосомным аномалиям: дети первого года жизни и дети старшего возраста (1–17 лет с пиком заболеваемости 2–5 лет). При этом у больных младше 1 года наиболее распространенными являются перестройки гена MLL с преобладанием 11q23/MLL [3], в то время как пациенты старшей возрастной группы характеризуются большим диапазоном изменений, из которых особенно часто встречаются t(12;21) и t(1;19), приводящие к образованию химерных транскриптов ETV6/RUNX1 и TCF3/PBX1 соответственно [2, 4]. Также нередко среди больных детей отмечается гипердиплоидия с увеличением количества 4, 6, 10, 14, 17, 20 и X-хромосом [4, 5].

Для выявления генетических изменений, как правило, используются данные стандартного кариотипирования, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), варианты полимеразной цепной реакции, а также различные сочетания данных методов [3, 6].

Стоит отметить, что чувствительность методов в выявлении аномалий значительно различается. Так, наименьшей чувствительностью характеризуется стандартный метод кариотипирования (59,8% выявляемости структурных перестроек MLL), а наибольшей – FISH-исследование (73,1% выявляемости структурных перестроек MLL) [3]. Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) имеет наибольшую диагностическую значимость при острых миелобластных лейкозах (ОМЛ). Данная модификация ПЦР необходима для выявления транслокаций, участвующих в репрессии комплекса CBF, активации тирозинкиназ и их рецепторов. Кроме того, ОТ-ПЦР, согласно мнению ряда авторов, служит единственным способом идентификации трисомии 11 хромосомы при ОМЛ, а также мутаций RUNX1 [7]. При ОЛЛ ПЦР с обратной транскрипцией может использоваться наряду с FISH-исследованием для диагностики t(9;22) типа p190, а также образования химерных транскриптов ETV6/RUNX1, E2A/PBX1, SIL-TAL1 и некоторых других [8].

В связи с особой значимостью молекулярно-генетических перестроек при острых лимфобластных лейкозах и сложностями их диагностики изучение особенностей выявления хромосомных aberrаций различными методами представляется актуальным.

Цель исследования: изучить особенности выявления молекулярно-генетических перестроек у детей с острыми лимфобластными лейкозами с помощью различных методов для оценки их эффективности.

**Материал и методы исследования.** В ходе исследования провели ретроспективный анализ 155 историй болезни детей с первичными острыми лимфобластными лейкозами в возрасте от 6 месяцев до 17 лет, находившихся в гематологическом отделении ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» МЗ КК г. Краснодара в период 2016–2020 гг.

В соответствии с иммунофенотипом (по классификации EGIL) дети были распределены в две группы исследования: первую группу составили больные В-ОЛЛ (n=139), вторую – Т-ОЛЛ (n=16) (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика контингента исследования

Пол	Тип ОЛЛ (n=155)	
	В-ОЛЛ, n=139	Т-ОЛЛ, n=16
Ж	68	5
М	71	11
Возраст (Me(25–75%))		
Ж	4,0 (2,0–7,0)	7,0 (6,5–7,5)
М	3,8 (2,0–6,3)	6,5 (5,0–7,3)

Соотношение мальчиков и девочек в группе больных В-клеточным ОЛЛ составило 1,04:1, среди больных Т-ОЛЛ – 2,2:1. Медиана возраста у больных В-ОЛЛ составила 4,0 (девочки) и 3,8 года (мальчики), у детей с Т-ОЛЛ – 7,0 и 6,5 года соответственно.

Характер молекулярно-генетических перестроек оценивали по результатам стандартного кариотипирования и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). При этом стандартный цитогенетический анализ проводился с использованием дифференциального окрашивания хромосом с последующим кариотипированием в соответствии с международной номенклатурой хромосом человека. Флуоресцентная гибридизация *in situ* осуществлялась в присутствии ДНК-зондов Kreatech, CytoTest, MetaSystems к наиболее значимым транслокациям в соответствии с иммунологическим типом ОЛЛ.

Статистический анализ полученных данных производили в программе IBM SPSS Statistics 22.0. Количественные переменные вследствие их несоответствия закону нормального распределения оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, категориальные переменные – с помощью критерия Пирсона  $\chi^2$  с уровнем значимости при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** В ходе исследования больным детям

были проведены стандартное кариотипирование и FISH-исследование в 100% случаев (155 детей). При этом генетические аномалии были обнаружены в 52,2% случаев при FISH-исследовании и в 39,4% случаев при стандартном кариотипировании ( $\chi^2=6,277$ ,  $p\leq 0,05$ ). Нормальный кариотип без транслокаций при FISH-исследовании встречался среди детей значительно реже (9,7% больных), при этом у 59 детей (38,1%) при проведении стандартного кариотипирования не наблюдалось митозов (табл. 2).

Подобное соотношение выявляемости аномалий с помощью стандартного кариотипирования и гибридизации *in situ*, согласно А.В. Мисюрину [2017] и другим авторам, может быть обусловлено субмикроскопическим характером хромосомных аномалий, а также особенностями деления некоторых опухолевых клонов [6, 9]. Так, t(12;21)/ETV/RUNX1, химерный транскрипт SIL-TAL1 и некоторые перестройки гена MLL носят криптический характер, в связи с чем не могут быть определены при стандартном кариотипировании, а гипердиплоидные лейкозные клетки характеризуются низкой митотической активностью при культивировании, что также затрудняет процесс цитогенетического исследования [6, 10].

Таблица 2

Результаты молекулярно-генетических исследований

Тип исследования	Аномальный кариотип		Нормальный кариотип	
	В-ОЛЛ, количество детей	Т-ОЛЛ, количество детей	В-ОЛЛ, количество детей	Т-ОЛЛ, количество детей
Стандартное кариотипирование	55	6	31	4
FISH	73	8	66	8

Примечание: в таблице 2 не учтены данные о пациентах, в материале которых в ходе цитогенетического исследования не было обнаружено митозов (59 детей).

По итогам цитогенетического исследования детей обеих групп наиболее распространенными аномалиями стали: t(12;21)/ETV/RUNX1, диагностируемая в 22,6% случаев, гипердиплоидный клон с трисомией 4, 10, 17 хромосом, обнаруженный у 12,9% детей, а также перестройки генов TCF3/PBX1 и MLL у 5,1% и 3,9% больных соответственно. Причем среди генов-партнеров MLL отмечены ENL (В-ОЛЛ) и AF6 (Т-ОЛЛ). Гиподиплоидный клон с количеством хромосом 45-47 был отмечен у 4 детей и в 3 случаях сопровождался t(12;21), в 1 случае – перестройкой Т-клеточного рецептора. Остальные транслокации встречались единично и были представлены t(9;22), t(8;14), перестройками генов SIL-TAL1, CRLF2, IGH, TCR и TLX3.

Полученным результатам FISH-исследования соответствовали различные итоги стандартного кариотипирования. Так, наряду с наиболее распространенной

t(12;21)/ETV/RUNX1, носящей криптический характер, цитогенетическим методом были выявлены: дериватная 12 хромосома (3 случая), дополнительные +X, +5, +8, +10, +21 (3 случая), делеции 12p (1 случай). При выявлении трисомии по 4, 10, 17 хромосомам в цитогенетических данных отмечали добавочные +8, +14, +16, +18, +21, +X, а также определялись дупликации (dup (1)), дериватные и маркерные хромосомы (der (1); mar).

Подобные результаты согласуются с мнением ряда исследователей. На самом деле криптические перестройки в виде t(12;21) с образованием химерного онкогена ETV/RUNX1 выявляются у детей в 25% случаев, сопряжены с возрастом больных и характеризуются благоприятным прогнозом [6]. Так, в исследовании Г.А. Цаура и соавт. [2016] среди 172 детей первого года жизни больных с t(12;21) не было обнаружено, в то время как в исследовании Ж.В. Пермикина и соавт. [2018] данная аномалия диагностировалась в 22,4% случаев у детей старшего возраста [10]. Выявленные нами цитогенетические нарушения тоже часто отмечаются авторами и, как правило, ассоциированы с делецией 12p [6, 11].

Более распространенной аномалией среди детей разного возраста является наличие гипердиплоидного клона с количеством хромосом более 51. Причем подобные перестройки часто связаны с трисомией 4, 10, 17, 18 хромосом и характеризуются наиболее высокими показателями пятилетней бессобытийной выживаемости [12]. Однако существуют случаи гиподиплоидии под «маской» гипердиплоидии [13]. О подобных случаях сообщают в своем исследовании А. Carroll et al. [2019]. Согласно авторам, у некоторых больных в результате удвоения гиподиплоидного клона наблюдается эффект «маскировки» истинной ploидности клона, что приводит к диагностированию данного типа лейкоза как гипердиплоидного. По сравнению с благоприятным прогнозом при гипердиплоидном лейкозе гиподиплоидия характеризуется крайне плохим прогнозом основного заболевания, в связи с чем корректная диагностика данной генетической аномалии становится особенно важной. По мнению А. Carroll et al. [2019], в половине случаев «замаскированной» гиподиплоидии в FISH-исследовании выявляется небольшая популяция гиподиплоидных клеток, однако примерно у 57% больных признаки гиподиплоидного клона удается обнаружить лишь с помощью анализа микросателлитных панелей [13].

Самыми часто обнаруживаемыми генетическими аномалиями при ОЛЛ авторы считают перестройки в гене MLL, выявляемые в 70% случаев острых лимфобластных лейкозов, которые в зависимости от гена-партнера могут служить как благоприятными, так и неблагоприятными прогностическими факторами [14, 15]. Обнаруженные в нашем исследовании химерные транскрипты MLL составляют, однако, лишь 3,9% и являются довольно редкими аномалиями при ОЛЛ, по мнению ряда авторов [6]. При этом реорганизация MLL-ENL, выявленная у больного с В-ОЛЛ, характеризуется наихудшим прогнозом по

сравнению с MLL-AF6 у пациента с Т-ОЛЛ [6]. Таким образом, тенденция большого количества больных с перестройками MLL в нашем исследовании не прослеживается, что может быть обусловлено старшим возрастом детей, а также особенностями используемых для диагностики методов [3].

При анализе полученных данных о молекулярно-генетических перестройках было обнаружено 44 случая несоответствия стандартного кариотипирования результатам FISH-исследования (табл. 3).

Таблица 3

Расхождения в результатах молекулярно-генетических и цитогенетических методов

Тип ОЛЛ	Пол		Возраст, лет (Ме)	Результаты цитогенетики	Результаты FISH	N
	Ж (n)	М (n)				
В-ОЛЛ	Ж (n=9)	М (n=6)	5,55	Нет митозов	t(12;21)/ETV/RUX1	15
В-ОЛЛ	Ж (n=6)	М (n=1)	5,35	Нет митозов	Трисомия 4, 10, 17 хромосом	7
В-ОЛЛ	Ж	М	2,45	Нет митозов	t(1;19)/TCF3/PBX1	2
Т-ОЛЛ	М		3,6	Нет митозов	SIL-TAL1	1
В-ОЛЛ	М		2	Нет митозов	MLL	1
Т-ОЛЛ	М		11	Нет митозов	TLX3	1
В-ОЛЛ	Ж (n=6)	М (n=9)	4,46	47-58XX/XY,+4,+10,+17	Аномалии не выявлены	15
В-ОЛЛ	Ж		4	46XX,rob(14;21)(q10,q10),+2 1 [10]	Аномалии не выявлены	1
В-ОЛЛ	М		9	46XY,t(5;7)(q14;q11)[5]	Аномалии не выявлены	1

Среди них в 15 случаях (34%) флуоресцентной гибридизацией была обнаружена t(12;21)/ETV/RUNX1 при отсутствии митозов в стандартном цитогенетическом анализе. Подобные же наблюдения отмечались при детекции гипердиплоидного клона: в 7 случаях (16%) методом кариотипирования аномалия не была выявлена, а в 15 случаях (34%) обнаружена при стандартном кариотипировании и не подтверждена FISH-методом. Кроме того, у 3 детей методом FISH была обнаружена трисомия 4, 10, 17 хромосом при нормальном кариотипе, выявленном цитогенетическим методом. В 2 случаях в результате кариотипирования были обнаружены Робертсоновская транслокация t(14;21), а также t(5;7),

не подтвердившиеся при проведении FISH.

Подобное наблюдение соответствует данным, полученным Г.А. Цауром и соавт. [2011], исследовавшими особенности выявления различных генетических аномалий у детей с острыми лейкозами с помощью цитогенетического исследования, гибридизации *in situ* и ПЦР с обратной транскрипцией. По итогам изучения авторами также отмечается некоторое количество пациентов с перестройками MLL, обнаруженными методом ПЦР с обратной транскрипцией и не идентифицированными методом стандартного кариотипирования. Подобные расхождения в результатах исследований, по мнению авторов, наиболее часто ассоциированы с низкой чувствительностью цитогенетических методов к криптическим абберациям [11]. Немаловажным критерием снижения чувствительности стандартного цитогенетического исследования может служить также сниженная митотическая активность гипердиплоидного клона лейкозных клеток [6]. Однако также отмечается возможность снижения чувствительности метода вследствие малого количества проанализированных метафазных пластинок, составляющих в среднем 8–12 метафаз.

**Заключение.** ОЛЛ у детей отличаются значительной гетерогенностью и сопровождаются большим количеством молекулярно-генетических аномалий. При этом распространенность перестроек различного типа значительно изменяется с увеличением возраста больных. В связи с этим особенно важной является диагностика генетических аномалий, которая может быть сопряжена с большой долей ошибочных результатов, а также со снижением эффективности проводимой терапии. Поэтому наиболее целесообразным представляется комплексное использование молекулярно-генетических и цитогенетических методов для детекции хромосомных аббераций у больных детей.

### Список литературы

1. Лебедев В.В., Клещенко Е.И. Становление службы детской гематологии-онкологии в Краснодарском крае и ее деятельность в настоящее время // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2019. Т. 2. № 6. С. 90-95.
2. Hein D., Borkhardt A., Fischer U. Insights into the prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev.* 2020. Vol. 39. no.1 P. 161-171. DOI: 10.1007/s10555-019-09841-1.
3. Цаур Г.А., Флейшман Е.В., Попов А.М., Фечина Л.Г., Румянцев С.А. Генетическая гетерогенность острых лейкозов у детей первого года жизни // Онкогематология. 2016. № 1. С. 14-23.
4. Цыбакова Н.Ю. Мартынкевич И.С. Роль хромосомных маркеров в диагностике и

лечении острых лейкозов у детей // Педиатр. 2012. Т. 3. № 4. С. 41-48.

5. Rubnitz J.E, Wichlan D., Devidas M., Shuster J., Linda S.B., Kurtzberg J., Bell B., Hunger S.P., Chauvenet A., Pui C.H., Camitta B., Pullen J. Children's Oncology Group. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. J. Clin Oncol. 2008. Vol. 26. no. 13. P. 2186-2191.

6. Мисюрин А.В. Цитогенетические и молекулярно-генетические факторы прогноза острых лимфобластных лейкозов // Клиническая онкогематология. 2017. Т. 10. № 3. С. 317-323.

7. Демидова И.А. Использование молекулярно-биологических методов для определения генетических нарушений при миелоидных лейкозах и мониторингования минимальной остаточной болезни // ОГ. 2007. № 4. С. 17-25.

8. Мисюрин А.В. Основы молекулярной диагностики онкогематологических заболеваний // Российский биотерапевтический журнал. 2016. № 4. С. 18-24.

9. Shago M. Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Acute Lymphoblastic Leukemia. Meth Mol Biol. 2017. Vol. 1541. P. 257-278. DOI: 10.1007/978-1-4939-6703-2\_21.

10. Пермикин Ж.В., Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Ригер Т.О., Аракаев О.Р., Власова А.А., Ольшанская Ю.В., Казакова А.Н., Цвиренко С.В., Савельев Л.И., Цаур Г.А., Фечина Л.Г. Особенности иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом и наличием транслокации t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1 // Онкогематология. 2018. № 4. С. 93-103.

11. Цаур Г.А., Флейшман Е.В., Попов А.М., Сокова О.И., Алейникова О.В., Бойченко Э.Г., Волочник Е.В., Иванова А.С., Каленник О.В., Кирсанова Н.П., Кондратчик К.Л., Кустанович А.М., Лапотентова Е.С., Литвинов Д.В., Мартынкевич И.С., Мякова Н.В., Наседкина Т.В., Овсепян В.А., Ольшанская Ю.В., Плеханова О.М., Попа А.В., Ригер Т.О., Савельев Л.И., Стренева О.В., Стригалева М.В., Шорилов Е.В., Фечина Л.Г. Цитогенетическая и молекулярно-генетическая характеристики острых лейкозов у детей первого года жизни // Клиническая онкогематология. 2011. № 2. С. 134-141.

12. Зуховицкая Е.В., Фиясь А.Т. Острые лимфобластные лейкозы // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2015. Т. 3. С. 12-17.

13. Carroll A.J., Shago M., Mikhail F.M., Raimondi S.C., Hirsch B.A., Loh M.L., Raetz E.A., Borowitz M.J., Wood B.L., Maloney K.W., Mattano L.A. Jr, Larsen E.C., Gastier-Foster J., Stonerock E., Ell D., Kahwash S., Devidas M., Harvey R.C., Chen I.L., Willman C.L., Hunger S.P., Winick N.J., Carroll W.L., Rao K.W., Heerema N.A. Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. Cancer Genet. 2019. Vol. 238. P. 62-68. DOI:



10.1016/j.cancergen.2019.07.009.

14. Джумагазиева Д.С., Шевченко О.В., Бородулин В.Б., Свистунов А.А. Молекулярно-генетические маркеры в диагностике острого лимфобластного лейкоза у детей // Биомедицина. 2010. № 3. С. 68-70.

15. Emerenciano M., Agudelo Arias D.P., Coser V.M., de Brito G.D., Macedo Silva M.L., Pombo-de-Oliveira M.S. Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2006. Vol. 47. no. 5. P. 549-554.