

Молекулярно-генетические маркеры в диагностике острого лимфобластного лейкоза у детей

Д.С.Джумагазиева*, О.В.Шевченко*, В.Б.Бородулин**, А.А.Свистунов***

* Саратовский государственный медицинский университет
им. В.И.Разумовского, Саратов

** ООО «Геночип», Саратов

*** Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова, Москва

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – самое распространенное злокачественное заболевание у детей. ОЛЛ – это злокачественное заболевание гемопоэтической ткани, возникающее в результате соматической мутации генетического материала в кроветворной клетке с последующим формированием опухолевого клона. В структуре педиатрической онкологической патологии доля ОЛЛ составляет до 25% всех опухолей и до 75% всех гемобластозов. Характерной особенностью является так называемый младенческий пик – увеличение заболеваемости ОЛЛ до 75 на млн. в год в возрасте от 2 до 5 лет. Заболеваемость ОЛЛ претерпевает существенные географические вариации, составляя в среднем 30–40 случаев на 1 млн. населения в год.

Современная классификация острых лейкозов основывается на принципе принадлежности бластных клеток к определенному ростку кроветворения. В классификации учитываются цитогенетические и молекулярно-биологические особенности опухолевых клеток, их морфологические свойства, уровень дифференцировки, а также возможность развития болезни после лучевой терапии и применения химиопрепаратов (классификация ВОЗ 2001г.) Существует классификация, учитывающая экспрессию иммунологических маркеров – CD (кла-

стеры дифференцировки), которые указывают на степень зрелости составляющих опухоль клеток. Морфологическая классификация ОЛЛ, основанная на морфологических признаках опухолевых клеток, включает 3 группы согласно FAB-классификации – L1, L2, L3. Цитохимическая и цитогенетическая классификация более разнообразна и необходима как для уточнения морфологической классификации в сложных случаях, так и для выбора тактики лечения. Для диагностики и прогнозирования лейкозов применяется комплекс лабораторных методов. В настоящее время в клинических условиях стали регулярно использоваться методы цитогенетического определения лейкозного клона клеток.

Целью работы явилось сопоставление информативности цитогенетического и молекулярно-генетического методов диагностики ОЛЛ у детей.

Материалы и методы

Изучались лабораторные данные детей с онкогематологическими заболеваниями. В группу больных с первичным ОЛ вошли 17 детей, находившихся на лечении в клинике профпатологии и гематологии СГМУ с 2009 по 2010 гг., из них 8 девочек и 9 мальчиков. На момент постановки диагноза средний возраст со-

ставил 7,1 год (максимальный возраст 16 лет, минимальный – 1 год 8 месяцев).

Результаты и их обсуждение

При изучении пунктата костного мозга медиана количества бластных клеток составила 81,6% (максимум 99, минимум 45). В соответствии с FAB-классификацией у 11 пациентов (64,7%) выявлен L2 вариант, у 5 (29,4%) – L1 вариант, у 1 пациента (5,9%) – морфологический вариант идентифицировать не удалось, при иммунофенотипировании у данного пациента был выявлен острый бифенотипический лейкоз с преобладанием Т зрелого лейкоза (Т-IV). У остальных пациентов, согласно EGIL-классификации В – ОЛЛ (1995) диагностировано: у 12 пациентов (70,6%) выявлен В-ОЛЛ В-common (В-II)- достоверно более высокий уровень CD10+ и HLA-DR+; у 4 пациентов (23,5%) выявлен Т-клеточный ОЛЛ – про Т (Т-I) с экспрессией CD7+ и CD5+ маркеров и зрелый Т (Т-IV) с экспрессией CD3+ и CD1a+ маркеров.

Изменения в структуре хромосом, специфические хромосомные перестройки, приводящие к образованию химерных или слившихся генов, составляют генетическую основу ОЛЛ. Эти изменения являются независимыми диагностическими и прогностическими маркерами при лейкозах и могут применяться для определения прогноза и выбора стратегии терапии. Хромосомные аберрации встречаются примерно в 40-50% случаев острых нелимфобластных лейкозов и в 30-40% случаев острых лимфобластных лейкозов. Традиционно для анализа хромосомных аберраций используется цитогенетический метод. В данной работе проводилось культивиро-

вание костного мозга, дифференциальное G-окрашивание (по методу Seabright M.). Препараты анализировались с учетом Международной цитогенетической номенклатуры (Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J., 2009). Кариотипирование проводилось с помощью микроскопа Axiostar plus FL и программного обеспечения Видео-тест Карио 3.1. В каждом случае проанализировано не менее 20 метафазных пластинок клеток костного мозга.

При проведении цитогенетических исследований кариотипа костного мозга (7 пациентов при первичной диагностике и 4 исследования в динамике заболевания) были получены следующие результаты: в 4-х случаях (36,4%) выявлены структурные перестройки кариотипа dup (1)(q21; q32), t (8; 21) (q22;q22), t (9;12) (p12; p12), t (11;19) (q23; p13.3). В трех случаях (27,2%) был выявлен нормальный кариотип.

В настоящее время доступна и активно внедряется в клиническую медицину методика, разработанная в институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, основанная на гибридизации на биологическом микрочипе. Данный метод позволяет анализировать большое количество химерных транскриптов одновременно и очень удобен для диагностики лейкозов. Основой анализа является комбинированный подход, включающий обратную транскрипцию РНК пациента с последующей мультиплексной амплификацией продуктов химерных генов и гибридизацию амплифицированных фрагментов на биочипе. (Работа проводилась совместно с ООО «Геночип» г. Саратов). В исследовании использовался «ЛК-биочип» и были выбраны хромосомные транслокации для ОЛЛ: t (12;21) TEL/AML1, t (9;22)p190BCR/ABL,

t(1;19)E2A/PBX1, для ОНЛЛ – t (8;21) AML1/ETO, t (15;17)PML/RARA и инверсия inv (16) CBFB/MYH1, транслокация с участием гена MLL: t (4;11) MLL/AF4, t (9;11) MLL/AF9, t(11;19) MLL/ENL, t(11;19) MLL/ELL, t (6;11) MLL/AF6, t (10;11) MLL/AF10. Транслокация с участием гена MLL встречается у детей до года в 70-80% случаев ОЛЛ и 50-60% случаев ОНЛЛ и является важным фактором прогноза и подбора фармакотерапии. При хроническом миелоидном лейкозе патогмоничным признаком является наличие транслокации t(9;22) p210BCR/ABL.

При анализе гибридизации на микрочипах было выявлено отсутствие транслокаций t(12;21), t(9;22), t(1;19), t(8;21), t(15;17), inv(16), t(4;11), t(9;11), t(11;19), t(6;11), t(10;11); у 1 пациента при стандартном цитогенетическом обследовании выявлены численные изменения в кариотипе 47, XY, +8. У 1 пациента выявлена транслокация (12;21), при цитогенетическом анализе данная перестройка не была выявлена, возможно, в связи с минимальным клеточным клоном данной перестройки. Чувствительность цитогенетического метода 1:100, а чувствительность анализа на биочипах 1:10000.

Выводы

В работе показано, что результаты стандартного цитогенетического исследования кариотипа костного мозга коррелируют с результатами молекулярно-генетического тестирования на ДНК-биочипе. Использование этих методик в комплексе можно считать наиболее целесообразным.

Список литературы

1. **Гра О.А.** Генетический полиморфизм GST, NAT2, и MTRR и предрасположенность к развитию острого лейкоза у детей // Гра О.А., Глотов А.С., Кожекбаева Ж.М. // Молекулярная Биология. – 2008. – Т. 42. – С.1-13.
2. **Исаева, Е.А.** Хромосомные аберрации при лимфобластном лейкозе у детей. / Исаева Е.А., Жаринов В.С., Наседкина Т.В. // Детская онкология – 2004. – №4. – С.1-6.
3. **Mullighan C.G.** Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. / Mullighan C.G., Goorha S., Radtke I. // Nature. – 2007. – №446. – С.758-764.
4. **Pulte D.** Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century // Pulte D., Gondos A., Brenner H. // Blood. – 2009. – № 113(7). – С.1408-1411.