

На правах рукописи

ЛАТЫПОВА МАРИЯ ВАДИМОВНА

**РОЛЬ МНОГОЦВЕТНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ *IN SITU* ГИБРИДИЗАЦИИ
В КАЧЕСТВЕ УТОЧНЯЮЩЕГО МЕТОДА КАРИОТИПИРОВАНИЯ
ПРИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИХ СИНДРОМАХ**

3.1.28. Гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт – Петербург – 2024

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Гиндина Татьяна Леонидовна – д.м.н., заведующий лабораторией цитогенетики и диагностики генетических заболеваний клиники Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой, профессор кафедры гематологии, трансфузиологии, трансплантологии с курсом детской онкологии факультета послевузовского образования имени профессора Б.В. Афанасьева федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Поспелова Татьяна Ивановна – д.м.н., профессор, проректор по научной работе, заведующий кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Мартынкевич Ирина Степановна – д.б.н., руководитель Научно-исследовательского Центра клеточной и молекулярной патологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится “___” _____ 2024 г. в ___ часов, на заседании Диссертационного Совета 21.2.050.01 при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8, тел. 8(812) 338-71-04, e-mail: usovet@spb-gmu.ru) в зале заседаний Ученого Совета.

С работой можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте: <http://1spbgmu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
д.м.н., профессор, Заслуженный врач
Республики Северная Осетия – Алания



Марченко Валерий Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенную группу заболеваний системы крови опухолевой природы, в основе которых лежит поражение гемопоэтических стволовых клеток крови, возникающее вследствие генетических мутаций и эпигеномных нарушений, дающих преимущество в пролиферации патологическому клону клеток по сравнению с нормальным [Montalban-Bravo et al., 2018]. Это приводит к нарушению дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественниц гемопоэза и повышенной чувствительности их к проапоптотическим факторам, вследствие чего возникает неэффективный гемопоэз (дисэритропоэз, дисгранулоцитопоэз и дисмегакариоцитопоэз), что клинически проявляет себя цитопениями в периферической крови. Для терминальной стадии МДС характерно накопление бластных элементов в костном мозге с высоким риском трансформации заболевания в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) [Bersanelli M. et al., 2021]. МДС преимущественно встречаются у людей старшей возрастной группы [SEER*Stat Databases, 2017], в связи с чем проведение аллогенной трансплантации ГСК – единственного на данный момент метода излечения – у таких пациентов с учетом их коморбидности весьма затруднительно [Морозова Е.В. и др., 2022]. Патогенез МДС изучен до сих пор недостаточно. У половины таких пациентов встречаются хромосомные аномалии (ХА), при этом у части больных могут быть обнаружены сложные хромосомные aberrации (СХА) [Грицаев С.В. и др., 2013; Hwang K.-L. et al., 2014]. Точный анализ СХА затруднен ограничениями стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) хромосом [Granada I. et al., 2020; Yassmine M.N. Akkari et al., 2022]. Многоцветная флуоресцентная *in situ* гибридизация (mFISH) является молекулярно-цитогенетическим методом нового поколения, который позволяет одновременно идентифицировать все хромосомы в одном эксперименте [Zhang C. C et al., 2018; Zito Marino F. et al., 2021]. Данный подход, с одной стороны, позволяет прояснить природу СХА, выявить скрытые межхромосомные обмены, определить истинную природу дериватных и маркерных хромосом, а с другой – открывает дорогу для выяснения роли отдельных хромосом в патогенезе заболевания [Song Q. et al., 2017; Zhang C. C et al., 2018]. С клинической точки зрения данные цитогенетического анализа являются неотъемлемой составной частью диагностики и стратификации риска больных МДС. Современные системы оценки риска этого заболевания помимо клинической информации включают данные цитогенетики, в том числе такие категории как сложный (СК) и моносомный кариотипы (МК). Выделение моносомного кариотипа в СХА без mFISH проводить непросто из-за ограничений СЦИ [Xu W. et al 2010; Гребенюк Л.А. и др., 2018], поэтому довольствоваться только GTG-бэндингом в этих случаях неприемлемо. В последние годы стало больше исследований, посвященных изучению патогенеза МДС, механизмов его прогрессии и возникновения рецидива [Schanz et al, 2018; Gadji et al, 2019; Bersanelli et al. 2021]. При этом ведущее место в этих исследованиях занимает анализ не только драйверных мутаций, но и специфических молекулярных маркеров, таких как гены *BAALC* и *WT1* [Minetto et al, 2015; Мамаев и др. 2016; Rautenberg et al, 2021]. В процессе изучения экспрессии генов *BAALC* и *WT1* у пациентов с ОМЛ [Мамаев и др, 2020; Mamaev et al, 2020; Mamaev et al, 2021] были получены данные, которые свидетельствовали о наличии связи с экспрессирующими их ранними (*BAALC*) и более зрелыми (*WT1*) лейкозными

клетками-предшественницами миелопоэза, что позволяет оценивать динамику содержания этих клеток методом стандартной количественной ПЦР в реальном времени и открывает перспективы к пониманию патогенеза различных цитогенетических вариантов МДС.

Степень разработанности темы исследования

Цитогенетическое исследование является стандартом диагностики и стратификации риска у больных МДС, в том числе леченных алло-ТГСК [Arber D.A. et al., 2022]. В то же время, подключение к анализу СК новых молекулярно-цитогенетических методов исследования у больных МДС и ОМЛ проводили не часто [Van Limbergen H. et al., 2002; Barouk-Simonet E. et al., 2005; Trost D. et al. 2006; Babicka L. et al., 2007; Xu W. et al., 2010]. При этом детальный анализ сложных дериватных и маркерных хромосом, как правило, не выполнялся. По аналогии с этим, экспрессию гена *BAALC* и *WT1* в костном мозге больных МДС изучали недостаточно, без учета отдельных цитогенетических вариантов МДС [Thol F. et al., 2012; Minetto P. et al., 2015; Bersanelli M. et al., 2021].

Цель исследования

Оценить значение многоцветного и стандартного кариотипирования клеток костного мозга в изучении хромосомных нарушений при МДС и связанных с ними ОМЛ.

Задачи исследования

1. Изучить частоту встречаемости, клинические особенности, структуру aberrаций отдельных хромосом в изолированном варианте и в составе СК у пациентов с МДС и связанных с ними ОМЛ.
2. На основании детального анализа хромосомных нарушений с помощью многоцветной FISH проанализировать СК у пациентов с МДС и связанных с ними ОМЛ; изучить в них частоту вовлечения отдельных хромосом и структуру СХА с определением неслучайных межхромосомных обменов.
3. Сопоставить результаты исследования сложных и моносомных кариотипов у пациентов с МДС и связанных с ними ОМЛ, которые были получены с помощью техник: стандартного и многоцветного кариотипирования.
4. Изучить частоту вовлечения генетического материала различных хромосом в составе сложных дериватных и маркерных хромосом у пациентов с МДС и связанных с ними ОМЛ.
5. Изучить уровни экспрессии генов *BAALC* и *WT1* в клетках костного мозга у пациентов с различными цитогенетическими вариантами МДС.

Научная новизна

1. Использование метода mFISH у больных МДС и связанных с ними ОМЛ со сложными кариотипами позволило впервые определить состав сложно-перестроенных дериватных и маркерных хромосом и выявить неслучайное

вовлечение в их формирование генетического материала 7-й, 4-й, 8-й и 12-й пар хромосом.

2. С помощью метода mFISH впервые установлены неслучайные хромосомы-партнеры при формировании СК: для хромосомы 3 – 17-я; для 5-й – 7, 8, 12, 17-я; для 7-й – 2, 5, 12-я; для 8-й – 5, 12-я; для 12-й – 5, 7-я; для 13-й – 1, 5, 7-я.

3. Впервые показано, что экспрессия гена *BAALC* у 3/4 обследованных больных с синдромом изолированной делеции 5q была ниже порогового уровня, что объясняет особенности биологии этой патологии.

Теоретическая и практическая значимость

Применение современных молекулярно-цитогенетических методов исследования позволяет точно идентифицировать вовлечённые в перестройки хромосомы в составе сложно-перестроенных кариотипов, что оправдывает их более активное использование в клинике. В условиях современной лаборатории метод определения уровней экспрессии генов *BAALC* и *WT1* в клетках костного мозга больных МДС легко реализуется, что открывает путь для более глубокого изучения патогенеза МДС и оценки эффективности лечения на уровне гемопоэтических стволовых клеток.

Методология и методы исследования

В работе использованы клиничко-лабораторные, цитогенетические, молекулярно-цитогенетические и статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Хромосомные aberrации при МДС гетерогенны, определяются с разной частотой в изолированном варианте и составе СК, а также различаются у детей и взрослых.

2. Многоцветная FISH является важным молекулярно-цитогенетическим инструментом для уточнения сложных хромосомных aberrаций, которые представляются закономерными при МДС и ОМЛм.

3. Использование mFISH подхода для анализа сложного кариотипа у больных МДС и ОМЛм необходимо для точного определения истинных моносомий.

4. Анализ сложных кариотипов с помощью многоцветного кариотипирования создает условия для уточнения роли отдельных хромосом в патогенезе МДС. В сложных кариотипах хромосома 7 является самым частым донором генетического материала.

5. Повышенные уровни экспрессии генов *BAALC* и *WT1*, тесно связанные с экспрессирующими их лейкозными стволовыми клетками отмечены у большинства больных МДС. В противоположность этому, они находятся ниже порогового уровня у 3/4 больных с синдромом изолированной делеции 5q, что объясняется особой биологией данного варианта, и нуждается в дальнейшем углублённом изучении.

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы диссертационного исследования представлены на IV Конгрессе гематологов России (Санкт-Петербург, 2018), VI научно-практической конференции «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (Санкт-Петербург, 2021) и на 13-й Международной Европейской конференции по цитогеномике (онлайн формат, 2021).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствует паспорту научной специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови (пп. 3,8,10) медицинской отрасли науки.

Внедрение результатов исследования

Основные положения диссертации внедрены в практическую и научно-исследовательскую работу отделения онкогематологии СПб ГБУЗ «Детская городская больница №1», научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 8 научных работ, из которых 5 публикаций - в журналах, индексируемых в базе данных Scopus, из них 4 статьи - в изданиях, рекомендованных в перечне ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Личное участие автора

Автором была проанализирована литература, выявлена актуальность, сформулированы цель и задачи исследования. Диссертант провела сбор информации из медицинской документации пациентов, выполнила лабораторные исследования. Автор проанализировала полученные данные, провела интерпретацию полученной информации. В результате проведенной работы диссертантом были сформулированы основные положения, выносимые на защиту, выводы и даны практические рекомендации.

Структура работы

Диссертационная работа основана на анализе клинических и лабораторных данных 130 пациентов клиники НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачёвой. Она изложена на 140 страницах машинописного текста, иллюстрирована 37 рисунками и дополнена 13 таблицами. Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Последний содержит 118 литературных источников, в том числе 13 отечественных и 105 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика пациентов

В исследование включены 130 пациентов с МДС, которые проходили лечение в клинике НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой в период с 2008 по 2022 годы. СЦИ осуществляли на этапе установления диагноза, а у части пациентов – также до выполнения алло-ТГСК. У 27 пациентов со СК была выполнена mFISH. Помимо этого, у 25 больных проводили определение уровней экспрессии генов *BAALC* и *WT1* перед ТГСК. Общая структура выполненного исследования представлена на рисунке 1.

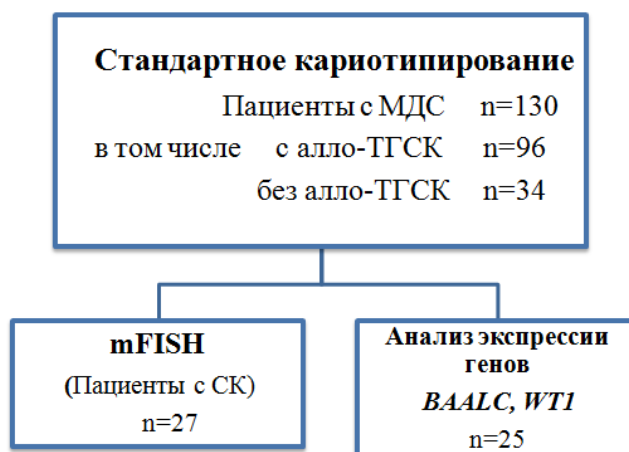


Рисунок 1– Структура исследования

Возраст больных варьировал от 1 до 87 лет (медиана 43 года), среди них была 71 женщина (55 %) и 59 мужчин (45 %), в том числе 19 (15 %) детей и 111 (85 %) взрослых. Согласно классификации ВОЗ 2016 года, у 93 (72 %) пациентов был установлен диагноз МДС с избытком бластных элементов (МДС-ИБ), где у 33 (26 %) больных - МДС-ИБ1, а у 60 (46 %) – МДС-ИБ2. Среди них были также пациенты с диагнозом МДС с многолинейной дисплазией (МДС-МД) (n=11, 9 %), МДС с однолинейной дисплазией (МДС-ЛД) (n=4, 3 %), с кольцевыми сидеробластами (МДС-КС) (n=3, 2 %), с кольцевыми сидеробластами и многолинейной дисплазией (МДС-КС/МД) (n=2, 1 %). Синдром изолированной делеции 5q- (МДС-5q) был установлен у 4 (3 %) больных. Сто семнадцать из 130 (90 %) обследованных пациентов отвечали критериям первичного МДС, а 13 других (10 %) – вторичного (втМДС). Прогрессия в ОМЛ была зафиксирована у 22/130 (17 %) пациентов, в том числе у 10 больных - в посттрансплантационном периоде и у 1 пациента – в предтрансплантационном. Аллогенная ТГСК была выполнена у 96/130 (74 %) пациентов.

Методы исследования

Для выполнения СЦИ применяли технику приготовления цитогенетических препаратов из краткосрочной 24-часовой культуры клеток костного мозга. Для накопления клеток на стадии метафазной пластинки использовали 10^{-5} раствор колхицина. Дифференциальную окраску хромосом проводили по GTG-технике с

использованием красителя эозина метиленового синего по Май-Грюнвальду после предварительной обработки препаратов 0,025% раствором трипсина. Анализ числа и структуры хромосом осуществляли с помощью микроскопа AxioImager (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Ikaros (Meta-Systems, Германия). Для каждого пациента оценивали не менее 20 метафазных пластинок. Анализ хромосомных нарушений и запись кариотипа производили в соответствии с критериями международной номенклатуры хромосом человека ISCN 2020. Клональными считали однотипные структурные ХА, а также числовые ХА с приобретением дополнительных хромосом, которые определялись в двух и более метафазных пластинках. При числовых ХА с уменьшением количества хромосом клональными считали нарушения, которые наблюдались в трех и более метафазах. При наличии трех и более ХА на метафазу кариотип считали сложным или комплексным. К моносомному относили кариотип с двумя аутосомными моносомиями или одной аутосомной моносомией и как минимум одной структурной ХА.

Для проведения mFISH использовали коммерческий 24XCyte ДНК-зонд производства Metasystems, который представляет собой смесь хромосомспецифичных ДНК-зондов, окрашивающих каждую пару хромосом человека своим цветом благодаря уникальной комбинации шести флуорохромов: DAPI (для фонового окрашивания хромосом), SpO, FITC, TxRed, Cy5 и DEAC. Анализ флуоресцентных сигналов проводили на микроскопе AxioImager M2 (Carl Zeiss, Германия), который оснащен люминесцентной лампой, а также имеет набор узкополосных флуоресцентных фильтров к необходимым флуорохромам. Программное обеспечение ISIS (MetaSystems, Германия) использовали для съемки и анализа флуоресцентных сигналов.

Исследования уровня экспрессии генов *BAALC* и *WT1* осуществляли в аспиратах костного мозга пациентов с МДС (n=25), с использованием количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-кПЦР). В качестве пороговых уровней экспрессии использовали величины 31 % для гена *BAALC* и 250 копий/10⁴ копий гена *ABL1* - для гена *WT1*.

Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics Version 20. Применяли методы описательной статистики, определяли процентные доли, медианы, среднее значение, минимум и максимум. Использовали непараметрические методы статистики с анализом таблиц сопряженности (критерий Хи-квадрат и точный критерий Фишера). Корреляционный анализ проводили с вычислением коэффициента попарной корреляции Пирсона для анализа парных связей. Статистически достоверными считали различия при значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая цитогенетическая характеристика больных МДС

Хромосомные аномалии кариотипа были выявлены у 99/130 (76 %) больных МДС, в том числе у 14 (74 %) детей и 85 (77%) взрослых. Структурные и количественные ХА наблюдались у 30 (30 %) и 23 (23 %) пациентов, соответственно, причём у 46/99 (47 %) больных МДС они имели смешанный характер. По характеру

ХА были сформированы несколько групп, куда вошли как пациенты с соответствующими изолированными ХА (в том числе с 1 ДХА), так и с ХА в составе СК. Наибольшая группа была представлена 47 (36 %) больными с аномалиями хромосом 7-й пары. Другие, менее многочисленные группы были представлены пациентами со структурными и численными повреждениями хромосом 5-й (n=30, 23 %), 3-й (n=25, 19 %), 8-й (n=21, 16 %), 13-й (n=19, 15 %) и 12-й (n=17, 13 %) пары (таблица 1).

Таблица 1– Структура аномалий хромосом 3, 5, 7, 8, 12 и 13 пары у пациентов с МДС

Хромосомные aberrации	Хромосомы						p
	3 (n=25)	5 (n=30)	7 (n=47)	8 (n=21)	12 (n=17)	13 (n=19)	
Изолированная ХА, n (%)	8 (32 %)	4 (13 %)	16 (34 %)	6 (29 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	<0,01
Изолированная ХА + 1 ДХА, n (%)	4 (16 %)	1 (3 %)	8 (17 %)	1 (4 %)	1 (6 %)	3 (16 %)	>0,05
ХА в составе СК, n (%)	13 (52 %)	25 (84 %)	23 (49 %)	14 (67 %)	16 (94 %)	15 (79 %)	<0,01
В том числе в составе СК:							
Делеция, n (%)	2 (15 %)	5 (20 %)	5 (22 %)	0 (0 %)	4 (25 %)	5 (33 %)	>0,05
Истинная моносомия, n (%)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (13 %)	0 (0 %)	1 (6 %)	0 (0 %)	>0,05
Трисомия, n (%)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	6 (43 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	<0,01
Несбалансированная транслокация, n (%)	9 (69 %)	21 (84 %)	19 (83 %)	8 (57 %)	11 (69 %)	9 (60 %)	>0,05
Реципрокная транслокация, n (%)	2 (15 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	1 (7 %)	>0,05
Изохромосома, n (%)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (14 %)	0 (0 %)	1 (7 %)	>0,05
Основные хромосомы - партнеры в СХА	17	7, 8, 12, 17	2, 5, 12	5, 12	5, 7	1, 5, 7	

Результаты цитогенетического анализа при отдельных цитогенетических вариантах МДС, уточненные техникой многоцветной FISH

Особенности хромосомных изменений 5-й хромосомы и их связь с клинической характеристикой больных МДС

В группу МДС со структурными и численными нарушениями 5-й хромосомы было включено 30 больных (таблица 1). Изолированная делеция 5q была зарегистрирована у 4 (16 %) взрослых пациентов, у одного - она сочеталась с 1 ДХА

(трисомия 8-й хромосомы). Все пациенты были с de novo МДС, в том числе с МДС-ИБ1 (n=1), МДС-ИБ2 (n=3), МДС-5q (n=1).

В то же время у большинства больных (n=25, 84 %) аномалии 5-й хромосомы входили в состав комплексного кариотипа, клинические характеристики которых будут рассмотрены в соответствующем разделе. В данной группе методом СЦИ было выявлено 13 пациентов со СК и моносомией 5-й пары хромосом. Однако методом многоцветной FISH ни одной моносомии хромосомы 5 подтвердить не удалось. Во всех наблюдениях хромосомный материал, принадлежащий хромосоме 5-й пары, был обнаружен в составе простых и сложных дериватных хромосом. Последние состояли из 3 и более фрагментов, и были образованы как на основе хромосомы 5 - $der(5)t(5;18;8)$ и $der(5)t(5;7;5;7)$, так и с включением её материала в состав других дериватных хромосом в виде $der(12)t(12;5;7)$ и $der(19)t(19;11;19;11;19;5)$. Среди aberrаций 5-й хромосомы в составе СК делеция 5q была представлена в 5 (20 %) наблюдениях (таблица 1). Делеции 5q, в основном, были интерстициальными и сопровождалась потерей хромосомных областей: 5q13-5q33 (n=4), 5q22-5q35 (n=2), 5q12-5q31 (n=1), 5q31-5q35 (n=1) и 5q13 (n=1). Кроме того, у одного пациента наблюдалась одновременная делеция и короткого, и длинного плеча 5-й хромосомы $der(5)del(5)(p11)del(5)(q11)$. Большинство перестроек 5-й хромосомы в СК (n=21, 84 %) представляли собой несбалансированные транслокации, причём самыми частыми хромосомами-партнерами были представители 7-й и 8-й пар (n=4 для каждой), а также 12-й и 17-й пар (n=3 для каждой). Хромосомный сегмент 5q11 чаще других (n=5) участвовал в межхромосомных обменах (рисунок 2, Б). Следует подчеркнуть, что многоцветная FISH не подтвердила моносомный кариотип ни одном СК в этой группе из-за «ложной» моносомии 5-й хромосомы.

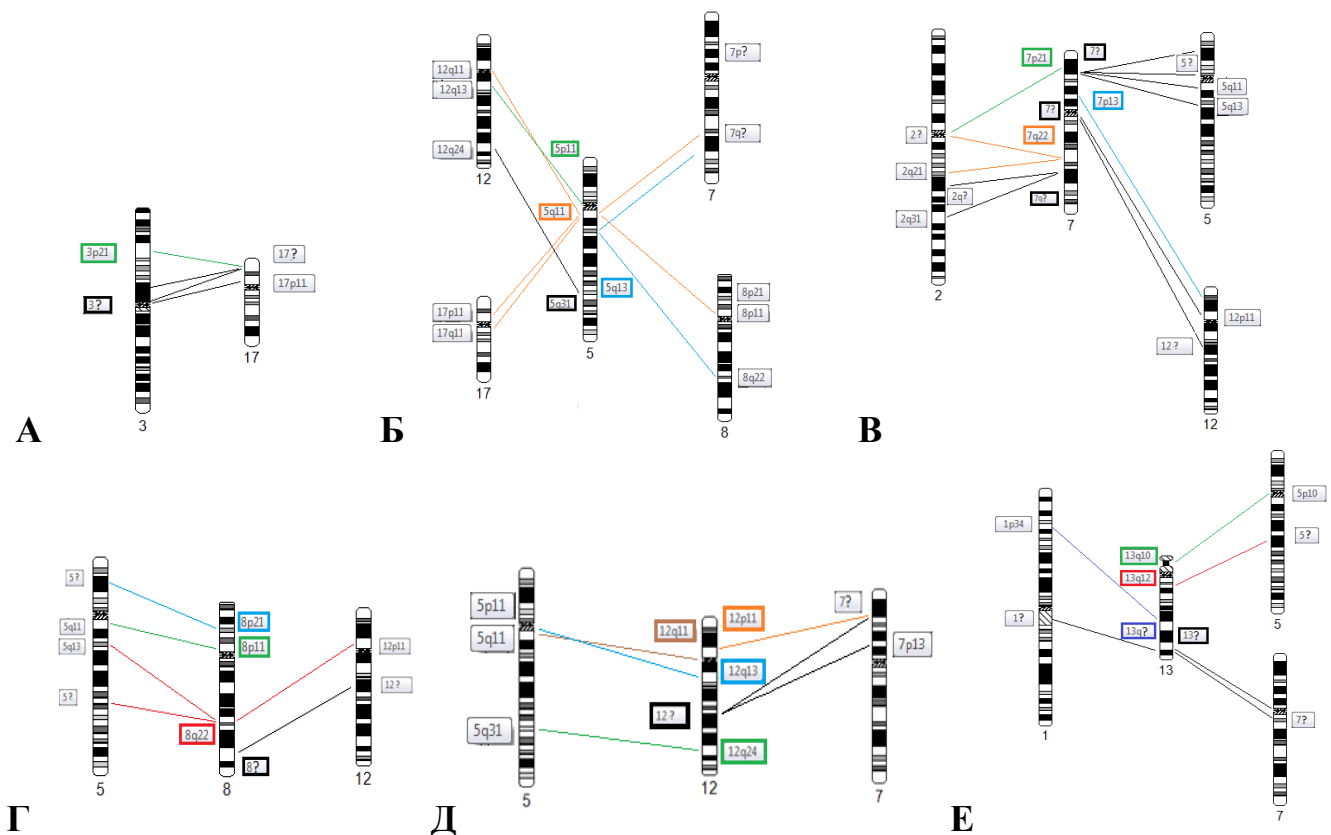


Рисунок 2 – Схематичное изображение межхромосомных обменов среди наиболее часто вовлекаемых в перестройки хромосом 3 (А), 5 (Б), 7 (В), 8 (Г), 12 (Д) и 13 (Е)

Особенности хромосомных изменений 7-й хромосомы и их связь с клинической характеристикой больных МДС

В группу МДС со структурными и численными нарушениями 7-й хромосомы было включено 47 больных (таблица 1). Изолированные аномалии 7-й хромосомы были выявлены у 16 (34 %) пациентов, с 1 ДХА - у 8 (17 %), в том числе у 14 (58 %) взрослых и 10 (42 %) детей. Из них моносомия хромосомы 7 была обнаружена у 13 (81 %) пациентов, делеция 7q – у 2 (25 %). У 8 (17 %) больных помимо аномалий 7-й хромосомы имелись ДХА: у 2 детей это была Робертсоновская транслокация t(13;14), а у взрослых - инверсия 3q26 (n=1), делеция 12p (n=1) и трисомия 21-й хромосомы (n=2). В этой группе преобладали пациенты с de novo МДС (n=23, 96 %), а также с морфологическими вариантами МДС-ИБ1 (n=9, 39 %), МДС-ИБ2 (n=8, 35 %), реже с МДС-ЛД (n=3, 13%), МДС-МД (n=3, 13 %). У 1 (4%) пациента была зафиксирована трансформация в ОМЛ.

Аномалии 7-й хромосомы входили в состав СК практически у половины больных (n=23, 49 %), характеристики которых будут рассмотрены в соответствующем разделе. Среди aberrаций 7-й хромосомы в составе СК моносомия 7-й хромосомы при СЦИ была зарегистрирована у 15 (65 %) больных. Между тем, при использовании в работе mFISH моносомный кариотип удалось подтвердить лишь у 3/15 (20 %) пациентов, поскольку у 12/15 (80 %) материал 7-й хромосомы был обнаружен в составе других aberrантных хромосом. Делеции 7-й хромосомы в СК определялись в 5 (22 %) наблюдениях. Они чаще затрагивали q-плечо, причём удалению подвергались различные области: 7q11 (n=1), 7q22-7q32 (n=1) и 7q32-7q36 (n=1). Кроме того, у двух пациентов делеции затрагивали оба плеча 7-й хромосомы с образованием дериватов der(7)del(7)(p11)del(7)(q11) и der(7)del(7)(p11)del(7)(q21). Многоцветная FISH показала, что большинство перестроек 7-й хромосомы в СК (83 % пациентов) представляли собой несбалансированные транслокации с участием хромосом 1-5, 8, 10-18, 21 и 22. При этом самыми частыми хромосомами-партнерами для 7-й хромосомы были 2-я (n=5), 5-я (n=4) и 12-я (n=3) (рисунок 2, В). Следует также отметить, что хромосома 7 была самым частым донором хромосомного материала при формировании сложных дериватных хромосом (n=7), чем, очевидно, можно объяснить низкий процент истинных моносомных кариотипов, верифицированных с помощью многоцветной FISH.

Особенности хромосомных изменений 8-й хромосомы и их связь с клинической характеристикой больных МДС

В группу МДС со структурными и численными нарушениями 8-й хромосомы был включен 21 больной (таблица 1). Изолированная трисомия хромосомы 8 была отмечена у 5 (71 %) взрослых пациентов и 2 (29 %) детей, из них у 1 ребенка она сочеталась с 1 ДХА (инсерцией в 1q неизвестного хромосомного материала). Эту группу составили пациенты с de novo МДС, где преобладали варианты МДС-ИБ1 (n=2, 29 %), МДС-ИБ2 (n=2, 29 %), реже были установлены другие морфологические варианты: МДС-ЛД (n=1, 14 %), МДС-МД (n=1, 14 %) и МДС-КС (n=1, 14 %).

У большинства пациентов (n=14, 67 %) aberrации 8-й хромосомы входили в состав СК, и их клинические характеристики будут рассмотрены в соответствующем разделе. Подключение к анализу СК mFISH показало, что трисомия 8-й хромосомы в составе СК имела место в 6 (43 %) наблюдениях, в то время как изохромосома 8 была

свойственна 2 (14 %) больным (таблица 1). У большинства пациентов со СК (n=8, 57 %) aberrации хромосомы 8 были представлены несбалансированными транслокациями с участием хромосом X, 1-5, 7, 10, 12, 13, 15 и 18, где самыми частыми хромосомами-партнерами были хромосомы 5 (n=4) и 12 (n=2) (рисунок 2, Г). Следует отметить, что в несбалансированных транслокациях хромосомный сегмент 8q21-22 участвовал в межхромосомных обменах чаще других (n=4), реже точки разрыва были представлены в 8p11(n=2) и 8q11(n=2) и других сегментах. Кроме того, материал хромосомы 8 участвовал в формировании сложных дериватов в трех наблюдениях, причем в одном из них были выявлены сразу 5 сложных дериватов с участием этой хромосомы (рисунок 3, В, Г, Е, Ж, И).

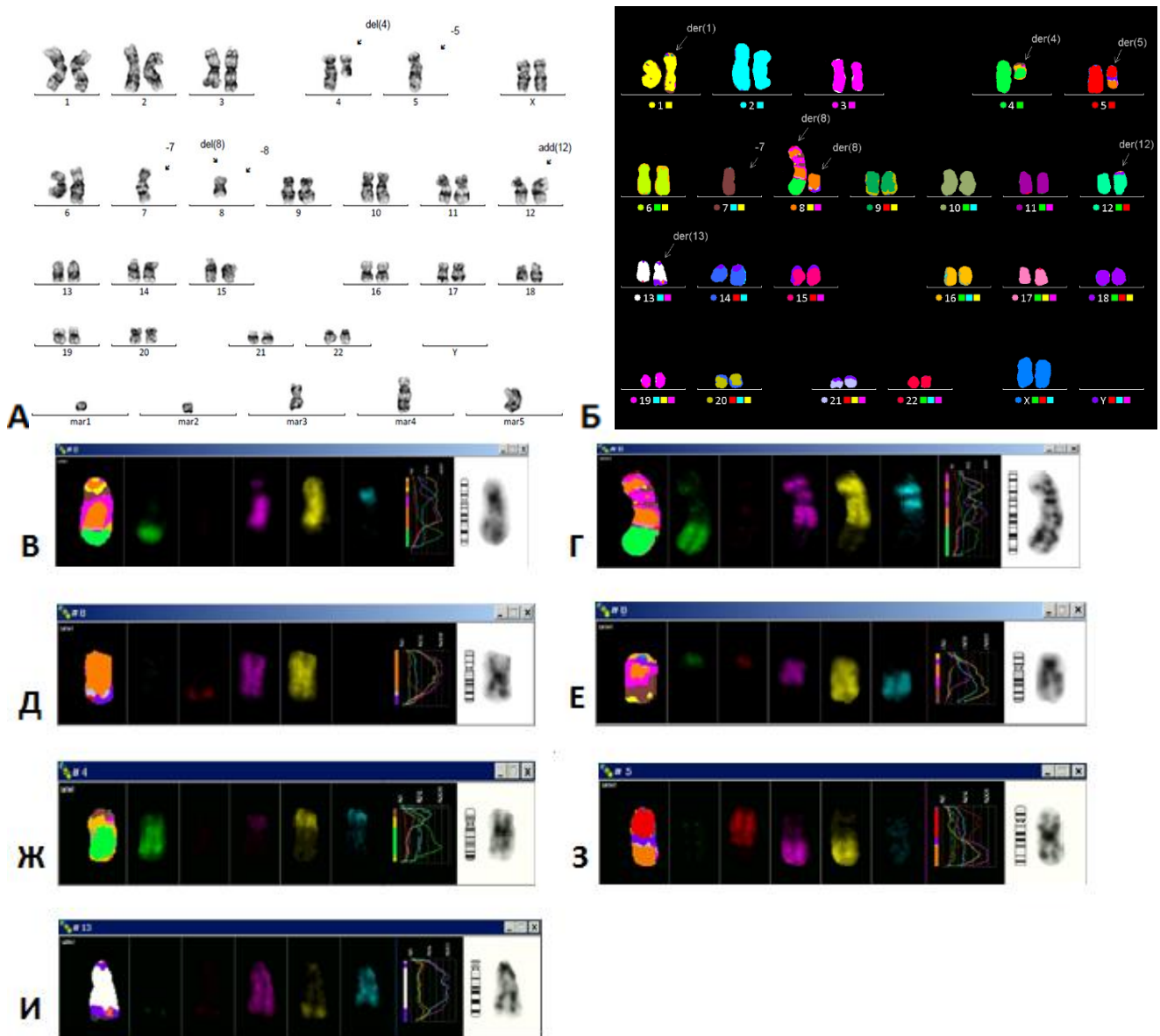


Рисунок 3 – Сложные кариотипы клеток костного мозга больной 22 лет с диагнозом МДС, выполненных в технике GTG-бэндинга (А) и mFISH (Б), вкпе с селективными кариограммами из разных метафазных пластинок, демонстрирующих вовлечение в перестройки 8-й хромосомы: $der(8)t(8;7;8;4)$ (В); $der(8)t(8;7;8;7;8;4)$ (Г); $der(8)t(5;8)$ (Д); $der(8)t(12;8;7)$ (Е); $der(4)t(7;8;4)$ (Ж); $der(5)t(5;8)$ (З); $der(13)t(13;8;12)$ (И) с итоговым кариотипом $ish.45,XX,t(1;12)(p36;p13),der(4)t(7;8;4),der(5)t(5;8)(q13;q22),-7,der(8)t(8;7;8;7;8;4),der(8)t(5;8)(q?q22),der(13)t(13;8;12)[cp10][24Xcyte]$

Особенности хромосомных изменений 3-й хромосомы и их связь с клинической характеристикой больных МДС

В группу МДС со структурными и численными нарушениями 3-й хромосомы было включено 25 больных (таблица 1). Изолированные аберрации были отмечены у 8 (32 %) взрослых пациентов и включали классические инверсии и транслокации с участием локуса 3q26 и гена *MESOM*. У 4 (16 %) пациентов они сочетались с 1 ДХА: потерей Y-хромосомы (n=1), моносомией хромосомы 7 (n=1), трисомией 13-й (n=1) и 21-й (n=1) хромосомной пары. Это были исключительно взрослые пациенты с *de novo* МДС (n=12, 48 %) с преобладающим морфологическим вариантом МДС-ИБ2 (n=11, 92 %), где у 3 (25 %) пациентов была зафиксирована трансформация в ОМЛ.

Аномалии хромосомы 3 входили в состав СК у половины пациентов (n=13, 52 %), клинические характеристики которых будут рассмотрены в соответствующем разделе. Следует отметить, что в СК классических транслокаций с участием локуса 3q26 не было зарегистрировано. Применение mFISH показало, что в большинстве наблюдений (n=11, 69 %) были выявлены несбалансированные транслокации, где неслучайным партнером в транслокациях 3-й хромосомы была хромосома 17 (n=4) (рисунок 2, А). При этом ни одного сложного деривата, образованного на основе 3-ей хромосомы, выявлено не было, хотя фрагменты её были отмечены в сложных дериватах, образованных на основе хромосом 9 (n=1), 12 (n=2) и 17 (n=1).

Особенности хромосомных изменений 12-й хромосомы и их связь с клинической характеристикой больных МДС

В группу МДС со структурными и численными нарушениями 12-й хромосомы было включено 17 больных (таблица 1). В данной группе изолированных аберраций 12-й хромосомы выявлено не было. У одного (6 %) взрослого пациента с МДС-ИБ2, возникшим *de novo*, была отмечена делеция 12p с 1 ДХА, представленной моносомией 7-й хромосомы.

При этом практически у всех больных (n=16, 94 %) аберрации 12-й хромосомы входили в состав СК, клинические характеристики которых будут рассмотрены в соответствующем разделе. При анализе результатов кариотипирования СК с использованием mFISH среди аномалий 12-й хромосомы делеция 12p была зарегистрирована у 4 (25 %) пациентов, а истинная моносомия 12-й хромосомы была выявлена у 1 (6 %). В то же время, у большинства пациентов с СК (n=11, 69 %) аберрации хромосомы 12 были представлены несбалансированными транслокациями с участием хромосом 1-5, 7, 8, 13, 17, 19 и 20-22. При этом неслучайными партнерами в транслокациях были хромосомы 5 и 7 (n=3 для каждой) (рисунок 2, Д). При этом в несбалансированных транслокациях участвовали разные хромосомные сегменты 12-й хромосомы, из них 12p11(n=1), 12q11(n=1), 12q13(n=1) и 12q24(n=1). Следует отметить, что хромосома 12 часто принимала участие в формировании сложных дериватов (n=7), причём как в качестве реципиента хромосомного материала (n=4), так и его донора (n=3).

Особенности хромосомных изменений 13-й хромосомы и их связь с клинической характеристикой больных МДС

В группу МДС со структурными и численными нарушениями хромосомы 13 было включено 19 больных (таблица 1). Изолированная аберрация 13-й хромосомы

была отмечена у 1 (5 %) взрослого пациента. У 3 (16 %) пациентов она сочеталась с 1 ДХА: реципрокной транслокацией t(3;21) у 1 взрослого пациента и моносомией 7 у 2-х пациентов детского возраста. У всех 4 пациентов был установлен диагноз *de novo* МДС с морфологическими вариантами МДС-ИБ1 (n=1), МДС-ЛД (n=2), МДС-МД (n=1).

Аномалии хромосомы 13 входили в состав СК у большинства больных (n=15, 79 %), клинические характеристики которых будут рассмотрены в соответствующем разделе. Результаты mFISH показали, что в составе СК у 5 (33 %) пациентов была зарегистрирована делеция хромосомы 13, где чаще определялось удаление сегментов 13q12-13q22 (n=2), реже утрачивались сегменты 13q12-13q14 (n=1), 13q11 (n=1) и 13q14 (n=1). В то же время более половины aberrаций 13-й хромосомы в СК (n=9, 60 % пациентов) представляли собой несбалансированные транслокации с участием хромосом 1, 3-5, 7, 8, 12, 14, 16, 19, 21 и 22, где самыми частыми партнерами в этих транслокациях были 1-я, 5-я и 7-я хромосомы (n=2 для каждой; рисунок 2, E). Следует заметить, что материал 13-й хромосомы активно принимал участие в формировании сложно-перестроенных дериватных и маркерных хромосом (n=4).

Таким образом, изолированные аномалии хромосом 3, 5 и 12 были выявлены только у взрослых пациентов, в то время как изолированные aberrации хромосом 7, 8 и 13 были зарегистрированы как у детей, так и у взрослых. Самой частой ХА в детском возрасте по нашим наблюдениям стала моносомия хромосомы 7 (n=10, 71 %) как в изолированном варианте (n=4, 40 %), так и с 1 ДХА (n=6, 60 %). Частота вовлеченности хромосом в изолированные перестройки и в состав СК была разной. Так, ХА 7-й хромосомы (n=16, 34 %) были чаще изолированными нарушениями по сравнению с aberrациями 12-й (n=0, 0 %) p=0,003 и 13-й (n=1, 5 %) p=0,015 хромосомных пар. В то же время, aberrации 12-й хромосомы (n=16, 94 %) чаще регистрировались в составе СК по сравнению с ХА 3-й (n=13, 52 %) p=0,004, 8-й (n=14, 67 %) p=0,04 и 7-й (n=23, 49 %) хромосомных пар p=0,002.

Обобщенные результаты анализа СК с применением метода mFISH с углубленным изучением сложноперестроенных дериватных и маркерных хромосом

Группу больных МДС со сложным кариотипом составили 35/130 (26,9 %) пациентов с МДС, где преобладали взрослые пациенты (n=33, 94 %) с *de novo* МДС (n=28, 80 %). В этой группе преобладали такие морфологические варианты как МДС-ИБ1 (n=11, 31 %) и МДС-ИБ2 (n=14, 40 %), реже были зарегистрированы МДС-МД (n=2, 6 %) и МДС-КС (n=1, 3 %). У пациентов со СК диагноз вторичного МДС был установлен чаще, по сравнению с общей группой пациентов с изолированными ХА 3, 5, 7, 8, 12, 13 хромосомных пар, где преобладали варианты *de novo* МДС (n=7/35 (20 %) vs n=1/53 (1,9 %), p=0,004). Кроме того, у пациентов со СК трансформация в ОМЛм была отмечена чаще по сравнению с группой пациентов с изолированными aberrациями хромосом 3, 5, 7, 8, 12, 13 (n=15/35 (42,9 %) vs. n=4/53 (8,7 %) p<0,001). Алло-ТГСК в качестве метода лечения применяли у 15 пациентов (43 %).

Для точной идентификации хромосом всем пациентам с доступным для исследования материалом (n=27, 77 %) с МДС/ОМЛм и сложным кариотипом в дополнение к СЦИ была выполнена mFISH. В формировании СК у больных МДС принимали участие все хромосомы, хотя частота их вовлеченности различалась. Чаще

других участником СХА была 5-я хромосома ($n=25$, 93 %). За ней, по мере снижения частоты встречаемости, следовали хромосомы 7 ($n=23$, 85 %), 12 ($n=16$, 59 %), 13 ($n=15$, 56 %), 8 ($n=14$, 52 %) и 3 ($n=13$, 48 %). Кроме того, у 21/27 (78 %) больного со СК имело место сочетанное повреждение хромосом 5 и 7, причём у 12 (44 %) пациентов оно было ассоциировано с перестройками 8-й хромосомы. В то же время ожидаемо высокой частоты встречаемости делеций 5q и 7q, также как моносомии 7 и трисомии 8 в составе СК установлено не было. К примеру, самая частая хромосомная aberrация при МДС – делеция 5q – у больных со СК определялась у 5/27 (19 %), делеция 7q и моносомия 7 – у 5/27 (19 %) и 3/27 (11 %), соответственно, а трисомия 8-й хромосомы – у 6/27 (22 %) больных. В свою очередь, несбалансированные транслокации с участием этих хромосом были преобладающими нарушениями генома и наблюдались у 21/27 (78 %), 19/27 (70 %) и 8/27 (30 %), соответственно. При этом большая часть ($n=5$, 55 %) делеций длинного плеча 5-й хромосомы скрывалась в несбалансированных транслокациях (рисунок 4).

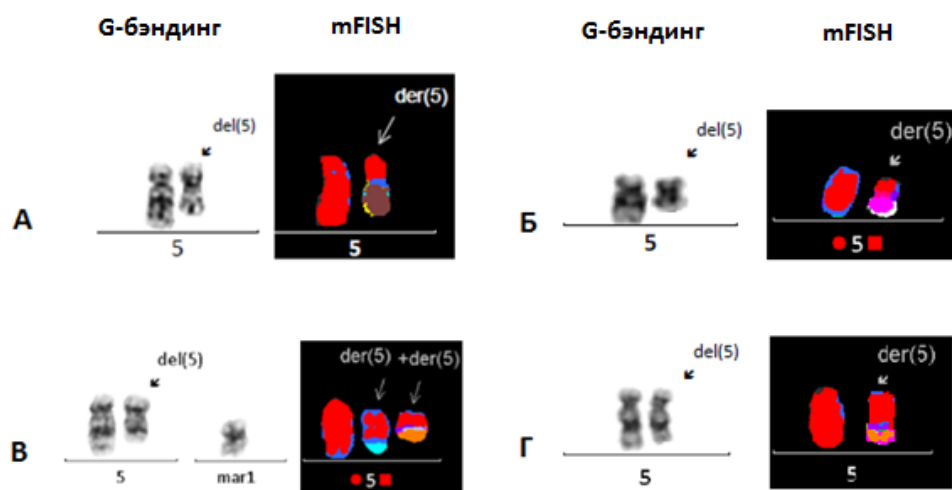


Рисунок 4 – Селективные кариограммы (А, Б, В, Г) клеток больных МДС со сложными кариотипами, которые демонстрируют расхождения в трактовках определения хромосомных аномалий 5-й хромосомы методами G-бэндинга и mFISH

При первичном анализе СК с помощью СЦИ были выявлены 68 моносомий различных хромосом у 22/27 (81 %) пациентов, в том числе моносомии 5 и 7 у 13/27 (48 %) и 15/27 (56 %) пациентов, соответственно. Однако только 6/68 (9 %) моносомий были подтверждены методом mFISH у 6/22 (27 %) пациентов, в том числе моносомия 7 у 3/15 (20 %) пациентов. Остальные моносомии, включая все моносомии 5-й хромосомы, оказались ложными.

Следует отметить, что сбалансированных транслокаций в составе СК от 27 пациентов было всего 8, здесь речь идёт о транслокациях $t(1;12)$, $t(3;15)$, $t(8;12)$, $t(8;20)$, $t(13;18)$, $t(18;20)$, $t(19;21)$ и $t(20;22)$. По нашим данным, делеции были более свойственны 5-й, 7-й, 12-й и 13-й хромосомам, а трисомии – хромосомам 8-й, 19-й и 21-й пар.

В большинстве наблюдений ($n=16/22$, 73 %) разновеликие фрагменты отсутствующих хромосом, окрашенных в технике mFISH, были обнаружены в числе маркерных и/или дериватных хромосом. Анализ состава всех несбалансированных транслокаций ($n=103$) показал, что некоторые хромосомы вступали во взаимодействие друг с другом намного чаще, чем другие. В частности, самыми

распространенными партнерами в несбалансированных транслокациях были хромосомы 2 и 7 (n=5); 5 и 7, 5 и 8, 3 и 17 (n=4 для каждой пары хромосом); 5 и 12, 7 и 12, 5 и 17 (n=3 для каждой пары хромосом).

Учитывая тесную связь хромосомы 17 (с картированным на её коротком плече геном *TP53*) со СК, мы рассматриваем её хромосомные aberrации в этом разделе. В изолированном варианте аномалии 17-й хромосомы обнаружены не были. В то же время материал хромосомы 17 участвовал в формировании СК у 10 (37 %) взрослых пациентов, среди которых у 7 (70 %) заболевание возникло *de novo*, а у 3 (30 %) – на фоне предшествующей терапии. У 2 (20 %) больных определялась делеция, затрагивающая в одном случае q-плечо, а в другом – оба плеча 17-й хромосомы. У большинства пациентов (n=9, 90 %) материал хромосомы 17 был выявлен в составе несбалансированных транслокаций с участием хромосом 3-5, 9, 11, 12, 16 и X-хромосомы. При этом неслучайным повторяющимся партнером в транслокациях была хромосома 3 (n=4), а часто вовлекаемым локусом – 17p11 (n=3). Кроме того, при участии хромосомы 17 были образованы сложные дериваты $der(17)t(X;1;18;11;17;X;8)$, $der(17)t(4;12;3;17)$ и $der(12)(13;7;3;17;12)$.

Отдельное внимание было уделено составу сложноустроенных маркеров, которые включали фрагменты трёх и более хромосом и имели место у 11/27 (41 %) МДС пациентов с комплексными кариотипами. Поскольку методы стандартной цитогенетики не позволяли точно идентифицировать все вовлекаемые в aberrации хромосомы, структуру сложных дериватов удалось расшифровать только благодаря подключению к работе возможностей mFISH. Как видно из данных, представленных в таблице 2, в кариотипах 11 пациентов было распознано 26 сложноустроенных дериватных хромосом, состоящих из фрагментов от 3 до 6 различных хромосом, причём в состав 13/26 (50%) дериватов хромосом входил генетический материал 7-й хромосомы.

Таблица 2 – Характеристика сложных дериватных и маркерных хромосом, состоящих их трёх и более фрагментов, идентифицированных с помощью многоцветной FISH

№№ п/п	Сложные дериваты из трех и более фрагментов разных хромосом
1	$der(1)t(14;20;1)$
2	$der(4)t(4;19;1)$
3	$der(4)t(7;8;4)$
4	$der(4)t(21;4;7)$
5	$der(5)t(5;18;8)$
6	$der(7)t(7;21;22)$
7	$der(8)t(8;7;8;4)$
8	$der(8)t(8;7;8;7;8;4)$
9	$der(8)t(12;8;7)$
10	$der(10)t(18;X;10)$
11	$der(12)t(13;7;3;17;12)$
12	$der(12)t(3;12;2)$
13	$der(12)t(12;5;7)$
14	$der(12)t(14;4;12)$

Продолжение таблицы 2

№№ п/п	Сложные дериваты из трех и более фрагментов разных хромосом
15	der(13)t(13;7;13;4)
16	der(13)t(13;8;12)
17	der(14)t(7;1;14)
18	der(17)t(4;12;3;17)
19	der(17)t(X;1;18;11;17;X;8)
29	der(18)t(11;18;7;2;22)
21	der(19)t(12;19;12;19;11;19)
22	der(19)t(19;11;19;11;19;5)
23	der(20)t(14;20;14;X)
24	der(21)t(21;7;4)
25	der(22)t(7;11;7;12;22)
26	der(X)t(21;X;21;12)

Далее, по мере уменьшения количества образованных дериватов, были следующие хромосомы: 12 (10/26, 38 %), 4 (9/26, 35 %) и 8 (7/26, 27 %) (таблица 2). При этом СХА предпочтительно формировались на основе хромосом 12 (4/26, 15 %), 4 (3/26, 11 %) и 8 (3/26, 11 %), а самым частым партнёром и донором хромосомного материала выступала 7-я хромосома (12/26, 46 %) (рисунок 5). Скорее всего именно эта находка объясняет низкий процент выявления истинных моносомий 7-й хромосомы в окрашенных в технике mFISH препаратах. Хромосомы 4 (6/26, 23 %), 12 (6/26, 23 %), 11 (5/26, 19 %) и 8 (4/26, 15 %) участвовали в образовании сложных маркеров несколько реже. Следует заметить, что по нашим данным хромосомы 6, 9, 15, 16 и Y не принимали участие в формировании сложных дериватов (рисунок 5).

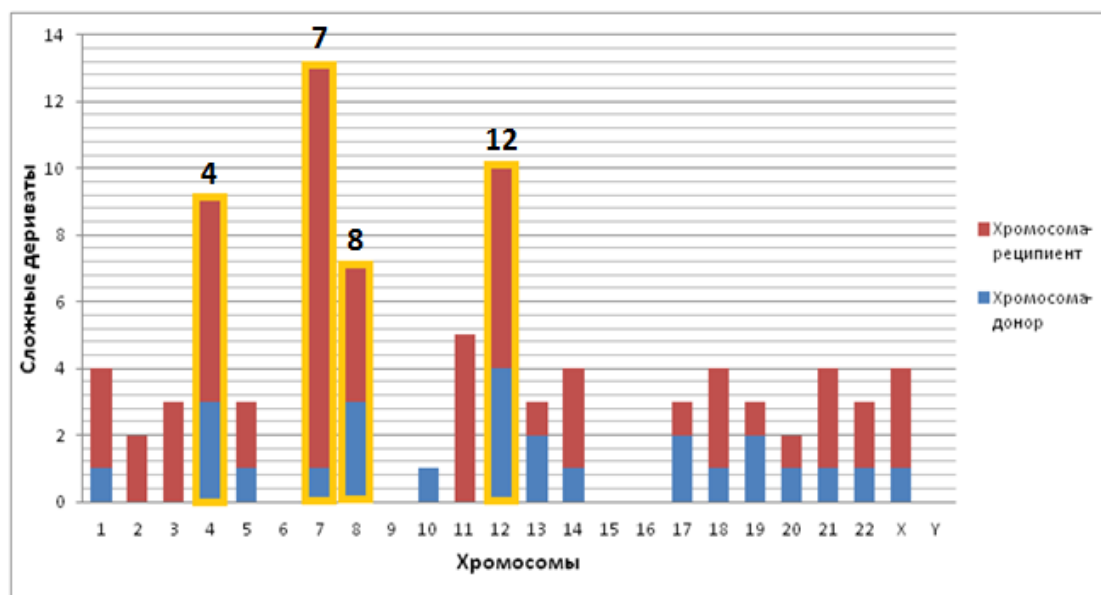


Рисунок 5 – Хромосомы, участвующие в сложных хромосомных обменах с образованием дериватов из 3 и более фрагментов разных хромосом

Таким образом, СЦИ полностью оправдывает себя при анализе простых кариотипов, однако, точный анализ СК стандартными методами весьма затруднен. Применение в работе mFISH позволило существенно дополнить и/или скорректировать результаты СЦИ у 100 % пациентов с комплексным кариотипом.

Анализ уровней экспрессии генов *BAALC* и *WT1* у пациентов с МДС

Последним этапом нашего исследования было изучение экспрессии генов *BAALC* и *WT1* в клетках костного мозга больных МДС с разными цитогенетическими вариантами. В исследуемую группу были включены 25 взрослых пациентов с МДС, где преобладали морфологические варианты МДС-ИБ2 (n=13, 52 %) и МДС-ИБ1 (n=7, 28 %). У 3 (12 %) пациентов был МДС-5q, у 1 (4 %) - втМДС и у 1 (4 %) больного – МДС-МД. ХА верифицировали методами СЦИ и mFISH. Среди них было 15 пациентов с делецией 5q, как в изолированном варианте, так и с ДХА, а также 10 пациентов с другими ХА: инверсией локуса 3q26, трисомией хромосомы 8, сложным и нормальным кариотипом.

Уровни экспрессии генов *BAALC* и *WT1* были исследованы у всех 25 пациентов до трансплантации. Уровни экспрессии гена *BAALC* варьировали от 1 % до 293 % (медиана - 58,00 %, среднее - 88,52 %). Уровни экспрессии гена *WT1* варьировали от 2 до 3114 копий *WT1*/10⁴ копий гена *ABL* (медиана - 234 копии, среднее - 663,76 копий). При этом содержание бластных элементов в тех же аспиратах костного мозга находилось в пределах от 0,2 до 27,6 % (медиана 8,8 %, среднее - 9,4 %).

Анализ уровней экспрессии гена *BAALC* в зависимости от цитогенетических aberrаций выявил следующее (рисунок 6).

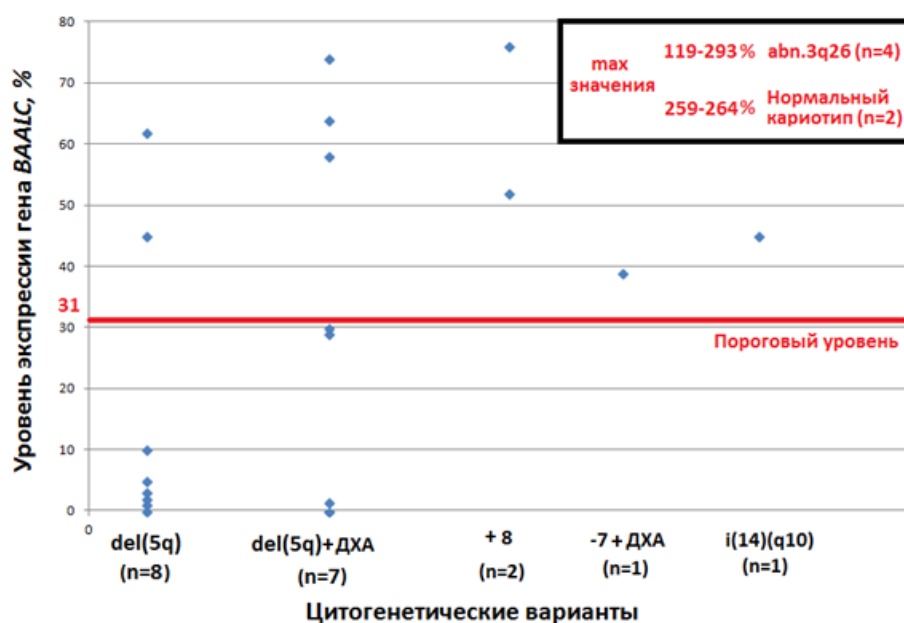


Рисунок 6 – Уровни экспрессии гена *BAALC* в клетках костного мозга при различных цитогенетических вариантах МДС

Низкая экспрессия гена *BAALC* (<31%) была отмечена у 10 (66,7 %) пациентов с делецией 5q-, из них у 6/8 (75 %) больных МДС с изолированной делецией 5q и у 4/7 (57 %) больных с 5q- и ДХА. Повышенный уровень экспрессии гена *BAALC* (от 45 % до 74 %) в группе больных с делецией 5q- был зарегистрирован у 5 (33,3 %) больных. Это был самый пожилой пациент (68 лет) с делецией 5q, пациент с ДХА (трисомия 8-й хромосомы), а также 3 пациента с делецией 5q в составе СК. В общей группе больных с отличными от 5q- цитогенетическими вариантами МДС, уровни экспрессии гена *BAALC* варьировали от 39 % до 293 %. Неожиданно высокими они оказались у больных с нормальными кариотипами и у пациентов с *EVII*-позитивными МДС. Таким образом, низкая экспрессия гена *BAALC* наблюдалась только у

пациентов с делецией 5q-, при других цитогенетических вариантах МДС экспрессия этого гена была выше порогового уровня.

Сравнительный анализ уровней экспрессии гена *WT1* в разных цитогенетических группах МДС показал, что пациенты с изолированной делецией 5q чаще имели экспрессию гена *WT1* ниже порогового уровня по сравнению с другими цитогенетическими вариантами ($n=6$ (75 %) vs. $n=5$ (31,25 %); $p=0,043$).

Корреляционный анализ был проведен для 21 пациента. Сопоставление уровней экспрессии гена *BAALC* и содержания бластов в костном мозге пациентов с МДС выявило прямую корреляционную зависимость между этими показателями ($r=+0,61$, $p=0,003$) (рисунок 7, А). Корреляционный анализ обнаружил также прямую зависимость между уровнем экспрессии гена *WT1* и содержанием бластов в костном мозге пациентов с МДС ($r=+0,47$, $p=0,03$) (рисунок 7, Б), а также между уровнями экспрессии самих генов *WT1* и *BAALC* ($r=+0,57$, $p=0,007$).

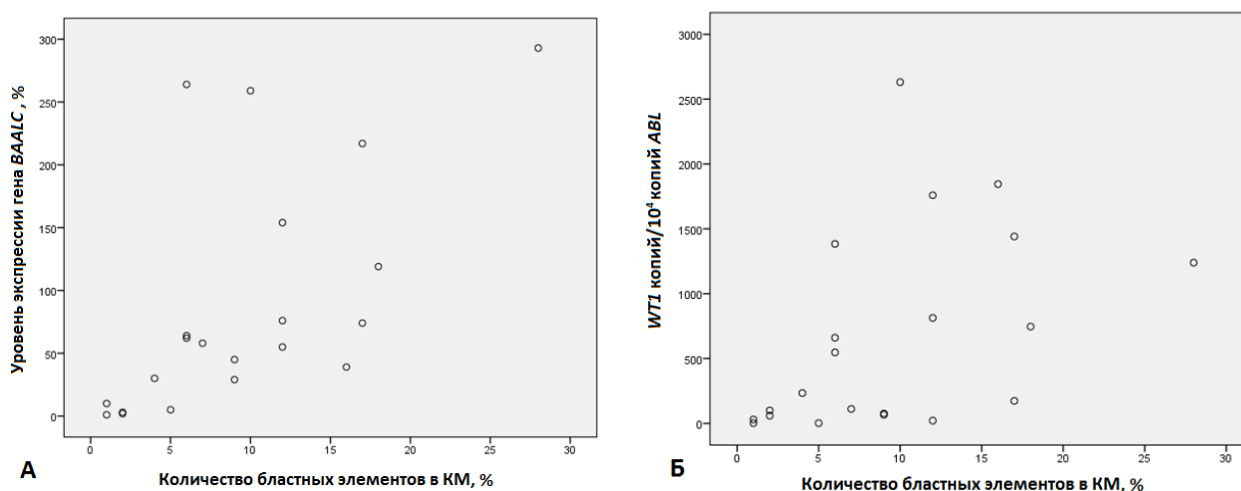


Рисунок 7 – Корреляционная зависимость между уровнями экспрессии генов *BAALC* (А) и *WT1* (Б) и содержанием бластных элементов в костном мозге у пациентов с МДС

Таким образом, полученные при МДС цитогенетические и молекулярные данные показывают, что в силу своих биологических характеристик эта патология может быть исследовательской площадкой для изучения тонких изменений генома опухолевых клеток. При этом, в силу сложности перестроенных при МДС кариотипов, активное внедрение в работу специализированных лабораторий возможностей точной идентификации вовлечённых в перестройки хромосом с помощью mFISH представляется необходимым.

ВЫВОДЫ

1. Результаты СЦИ и mFISH показали, что в ХА при МДС и ОМЛм чаще принимают участие хромосомы 7, 5, 3, 8, 13 и 12 с разной частотой вовлеченности в ИХА и состав СК. Так, ХА 7-й хромосомы чаще являются изолированными по сравнению с хромосомами 12 и 13 ($n=16$, 34 % vs $n=0$, 0 %; $p=0,003$; vs $n=1$, 5 %; $p=0,015$). ХА 12-й хромосомы ($n=16$, 94 %) чаще определяются в СК по сравнению с абберациями хромосом 3 ($n=13$, 52 %) $p=0,004$; 8 ($n=14$, 67 %) $p=0,04$; и 7 ($n=23$, 49 %) $p=0,002$. ИХА 3-й, 5-й, 12-й пар хромосом наблюдаются только у взрослых, а ИХА 7-й, 8-й, 13-й – и у детей, и у взрослых. У пациентов со СК трансформация в ОМЛм

происходит чаще по сравнению с пациентами с ИХА (n=15, 42,9 % vs. n=4, 8,7 %; p<0,001).

2. По данным mFISH в СК у пациентов с МДС и ОМЛм чаще принимают участие хромосомы 5 (n=25, 93 %), 7 (n=23, 85 %), 12 (n=16, 59 %), 13 (n=15, 56 %), 8 (n=14, 52 %) и 3 (n=13, 48 %). В СК сочетание aberrаций хромосом 5/7 (n=21, 78 %) и 5/7/8 (n=12, 44 %) является самым частым, где преобладают несбалансированные транслокации (n=26, 96 %). В СК классические перестройки локуса 3q26 отсутствуют, при этом доминируют несбалансированные ХА 3-й пары (n=11, 69 %). Основные хромосомы-партнеры в СХА неслучайны (для хромосомы 3 это 17-я; для 5-й – 7, 8, 12, 17; для 7-й – 2, 5, 12; для 8-й – 5, 12; для 12-й – 5, 7; для 13-й – 1, 5, 7 хромосомы).

3. Сравнение результатов кариотипирования показало, что mFISH дополняет и/или корректирует результаты СЦИ у 100 % пациентов со СК. Так, выявленные СЦИ 22 МК были подтверждены лишь у 6 (27 %) пациентов. Все 13 (100 %) моносомий 5-й хромосомы и 15 (80 %) моносомий 7-й хромосомы оказались ложными. За определяемыми СЦИ делециями 5-й хромосомы у 5 (55 %) пациентов скрываются несбалансированные транслокации с участием 5q.

4. Анализ состава сложных дериватных и маркерных хромосом у пациентов с МДС и ОМЛм с помощью mFISH показал неслучайное их формирование с участием хромосом 7 (n=13, 50 %), 12 (n=10, 38 %), 4 (n=9, 35 %) и 8 (n=7, 27 %). Самым частым донором генетического материала является хромосома 7 (n=12, 46 %), в свою очередь, хромосомы 6, 9, 15, 16 и Y не входят в состав сложных дериватных хромосом.

5. Уровень экспрессии гена *BAALC* в клетках костного мозга увеличен у 60 % (n=15) больных с различными цитогенетическими вариантами МДС. В то же время только у пациентов с делецией 5q (n=10, 66,7 %) он находится ниже порогового уровня (<31%). Кроме того, пациенты с изолированной делецией 5q чаще имеют экспрессию гена *WT1* ниже порогового уровня по сравнению с пациентами МДС с другими ХА (n=6, 75 % vs. n=5, 31,3 %; p=0,043). Обнаружена прямая корреляционная связь между содержанием бластов в костном мозге и уровнем экспрессии генов *BAALC* (r=+0,61, p=0,003), *WT1* (r=+0,47, p=0,03), а также между уровнями экспрессии генов *BAALC* и *WT1* (r=+0,57, p=0,007) у пациентов с МДС.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Цитогенетический анализ является обязательным этапом диагностики и стратификации риска больных МДС и должен выполняться на этапе установления диагноза, рецидива или прогрессии заболевания, до и после алло-ТГСК. В случаях со сложным кариотипом СЦИ следует дополнять mFISH для точной идентификации вовлеченных в aberrации хромосом, а также выделения самой неблагоприятной генетической группы при МДС и ОМЛм - моносомного кариотипа. Определение уровня экспрессии генов *BAALC* и *WT1* позволяет изучать патогенез и прогноз у больных с различными вариантами МДС на уровне *BAALC*- и *WT1*-экспрессирующих лейкозных стволовых клеток и клеток-предшественниц миелопоэза.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты, полученные при выполнении этого исследования, могут являться базой для продолжения изучения фундаментальных вопросов, касающихся геномных дисбалансов при МДС, что поможет расширить представление о генетических профилях этих пациентов. Актуальными темами для дальнейшего исследования

могут быть следующие: углубленное изучение неслучайных повреждений хромосом в СК с помощью многоцветного бэндинга для более точного определения участвующих в СХА хромосомных сегментов, а также с помощью молекулярно-генетических исследований, в частности, ВПС с анализом транскриптома. Перспективным видится изучение экспрессии генов *BAALC* и *WT1* у пациентов с МДС без ХА, а также у других онкогематологических пациентов с целью ранней верификации прогноза заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Латыпова, М.В. Результаты трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток при миелодиспластических синдромах с трисомией 8 и/или моносомией 7 / М.В. Латыпова, Н.Н. Мамаев, Т.Л. Гиндина [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2022. – Т. 15. – № 2. – С. 198–204.
2. Латыпова, М.В. Цитогенетическая характеристика сложных кариотипов методом многоцветной FISH при миелодиспластических синдромах и связанных с ними острых миелоидных лейкозах / М.В. Латыпова, Н.Н. Мамаев, Т.Ю. Грачева [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2022. – Т. 15. – № 4. – С. 396–413.
3. Латыпова, М.В. Влияние цитогенетических aberrаций на результаты алло-ТГСК у пациентов с МДС / М.В. Латыпова, И.А. Петрова, Т.Ю. Грачева [и др.] // Вестник гематологии. – 2021. – Т. 17. – № 2. – С. 62.
4. Мамаев, Н.Н. Роль *BAALC*-экспрессирующих лейкозных клеток-предшественниц в патогенезе миелодиспластических синдромов / Н.Н. Мамаев, М.В. Латыпова, А.И. Шакирова [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2022. – Т. 15. – № 1. – С. 62–68.
5. Gubina, M.V. Impact of cytogenetic aberrations divided into 5 prognostic groups upon outcomes of allo-HSCT patients with myelodysplastic syndromes / M.V. Gubina, T.L. Gindina, N.N. Mamaev [et al.] // Cellular Therapy and Transplantation. – 2017. – Т. 6. – № 3. – С. 43-44.
6. Mamaev, N.N. Evaluation of *BAALC*- and *WT1*-expressing leukemic cell precursors in pediatric and adult patients with *EVII*-positive AML by means of quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) / N.N. Mamaev, A.I. Shakirova, I.M. Barkhatov, M.V. Latypova [et al.] // Cellular Therapy and Transplantation. – 2021. – Т. 10. – № 2. – С. 54-59.
7. Mamaev, N.N. Trisomy 8 is associated with favorable outcome in the patients with myelodysplastic syndromes treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / N.N. Mamaev, M.V. Latypova, T.L. Gindina [et al.] // Journal of Hematology Research. – 2022. – Т. 9. – С. 15-18.
8. Mamaev, N. New insights into the nature of the 5q- deletion syndrome based on quantitative measurement of *BAALC*- expressing stem cell burdens / N.N. Mamaev*, A.I. Shakirova, T.L. Gindina, M.V. Latypova [et al.] // Journal of Hematology Research. – 2023. – Vol. 10. – P. 6–10.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

втМДС – вторичный миелодиспластический синдром

ВПС – высокопроизводительное секвенирование

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ДХА – дополнительные хромосомные аномалии

ИХА – изолированные хромосомные aberrации

КМ – костный мозг

МДС – миелодиспластический синдром

МДС-5q – миелодиспластический синдром с изолированной делецией 5q

МДС-ЛД – миелодиспластический синдром с однолинейной дисплазией

МДС-МД – миелодиспластический синдром с многолинейной дисплазией

МДС-КС – миелодиспластический синдром с кольцевыми сидеробластами

МДС-ИБ1 – миелодиспластический синдром с избытком бластов 1

МДС-ИБ2 – миелодиспластический синдром с избытком бластов 2

МК – моносомный кариотип

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ОМЛм – острый миелоидный лейкоз из предшествующего миелодиспластического синдрома

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

СК – сложный (комплексный) кариотип

СХА – сложные хромосомные aberrации

СЦИ – стандартное цитогенетическое исследование

ХА – хромосомные аномалии

BAALC -э ЛСК – *BAALC* -экспрессирующие лейкозные стволовые клетки

FISH – fluorescence *in situ* hybridization (флуоресцентная *in situ* гибридизация)

mFISH – multicolor fluorescence *in situ* hybridization (многоцветная флуоресцентная *in situ* гибридизация)