

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ХРОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ,  
ЗАТРАГИВАЮЩИХ ГЕНЫ *ETV6(TEL)* ИЛИ *RUNX1(AML1)*, МЕТОДОМ FISH  
ПРИ *ETV6/RUNX1*-ПОЛОЖИТЕЛЬНОМ В-КЛЕТОЧНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ**  
**DETERMINATION OF ADDITIONAL CHROMOSOMAL ABERRACIES OF E-TERNING  
GENES OF *ETV6 (TEL)* AND / OR *RUNX1 (AML1)* BY FISH METHOD  
AT *ETV6 / RUNX1*-POSITIVE B-CELLULAR LEUKAGE IN CHILDREN**

***E. H. Зотова*<sup>1,2</sup>, *V. С. Степук*<sup>1</sup>, *V. П. Букам*<sup>2</sup>, *E. В. Волочник*<sup>2</sup>  
*K. Zotava, V. Stsiapuk, V. Bukat, A. Valochnik***

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет,

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,  
г. Минск, Республика Беларусь  
*katyshazt@gmail.com*

<sup>1</sup>Belarusian State University,

<sup>2</sup>Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,  
Minsk, Republic of Belarus

Наиболее частой хромосомной абберрацией при острых лейкозах у детей является t(12;21), которая обнаруживается в 25–30 % случаев В-ОЛЛ. При данном типе лейкозов обнаруживается большое количество повторяющихся дополнительных хромосомных абберраций: делеции нетранслоцированных копий генов *ETV6* и *RUNX1*, наличие их дополнительных копий и др. Нами было исследовано 90 случаев В-ОЛЛ у детей с подтвержденным *ETV6/RUNX1(+)* статусом (ПЦР) на наличие дополнительных изменений в интактных генах *ETV6* и *RUNX1* методом FISH. В 76,7 % случаев была обнаружена делеция нетранслоцированной копии *ETV6*. В 27,4 % детектировалась дополнительная копия *RUNX1*, а в 6,8 % случаев нетранслоцированная копия *RUNX1* была делетирована. В 72,2 % случаев выявлялось два и более субклона лейкозных клеток.

t(12;21) is the most common chromosomal aberration in childhood acute lymphoblastic leukemia, its alteration occurs in 25–30 % of cases B-ALL. This type of leukemia contains many different recurrent additional chromosomal aberrations such as deletions of untranslocated *ETV6* and *RUNX1* genes, its extra copies etc. We investigated 90 cases of childhood B-ALL with a confirmed *ETV6/RUNX1(+)* (PCR) by FISH technique. Additional changes in untranslocated *ETV6* and *RUNX1* alleles were detected in 86,7 %. Extra copy of *RUNX1* gene was found in 27,4 % of cases, also 6,8 % cases had *RUNX1* copy deleted. In 72,2 % cases were detected two and more leukemia cells subclones.

**Ключевые слова:** В-ОЛЛ, *ETV6/RUNX1*, *TEL*, *AML1*, дополнительные хромосомные абберрации, FISH, гетерогенность, дети.

**Keywords:** B-ALL, *ETV6/RUNX1*, *TEL*, *AML1*, additional chromosomal aberrations, FISH, heterogeneity, children.

Отличительной чертой гемобластозов является наличие множества повторяющихся хромосомных аномалий. В настоящее время по классификации ВОЗ 2016 выделяют 7 цитогенетических подгрупп В-клеточных острых лимфобластных лейкозов (В-ОЛЛ), в зависимости от выявляемых хромосомных перестроек. Наиболее часто встречаемой хромосомной абберрацией при острых лейкозах у детей является t(12;21)(p13;q22) (выявляется в 25–30 % случаев).

Данная транслокация затрагивает гены *ETV6* и *RUNX1* (также известные как *TEL* и *AML1*, соответственно) и является криптической, то есть недоступной для обнаружения методом дифференцированной окраски хромосом (основной метод при цитогенетической диагностике). Однако существующие в настоящее время более чувствительные методы, как флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) и ПЦР, в реальном времени, позволяют без труда выявить данную аномалию.

t(12;21)(p13;q22) приводит к образованию химерного онкогена *ETV6/RUNX1*, выполняющего функцию репрессора транскрипции в модельных системах. Данный факт позволяет предположить, что его продукт – химерный белок – играет ключевую роль в лейкемогенезе. Основываясь на данных, полученных при изучении модельных систем, транслокация *ETV6/RUNX1* возникает *in utero*, однако данного события самого по себе недостаточно для развития заболевания – необходимы вторичные генетические изменения. По поводу того, какие именно изменения влекут за собой развитие лейкоза и какова их роль в лейкемогенезе, ведутся дискуссии. Дополнительные генетические изменения, такие как потеря нетранслоцированной копии *ETV6*, наличие дополнительной копии *RUNX1*, дупликация *ETV6/RUNX1*, а также абберрации с участием гена *MLL*, подтверждают гипотезу, выдвинутую на основании результатов изучения модельных систем, о том, что вторичные изменения необходимы для лейкемогенеза и дальнейшего прогрессирования заболевания.

*ETV6/RUNX1(+)* В-ОЛЛ генетически гетерогенен, описано множество дополнительных хромосомных перестроек, ассоциированных с данной транслокацией, что делает данный лейкоз интересным объектом для изучения клональной эволюции при гемобластозах.

Цель данной работы – охарактеризовать дополнительные хромосомные перестройки при *ETV6/RUNX1*-положительных В-ОЛЛ.

В настоящем эксперименте было проведено молекулярно-цитогенетическое исследование пунктата костного мозга группы пациентов с *ETV6/RUNX1(+)* В-ОЛЛ, состоящей из 90 человек (44 мужского пола и 46 женского). Наличие транслокации было подтверждено методом ПЦР. Медиана возраста составила 3 года (от 1 года 7 мес. до 11 лет 6 мес.). В ходе исследования проводилось выделение моноклеарных клеток с дальнейшим краткосрочным культивированием (24 ч) и фиксацией. Фиксированный материал раскапывался на предметные стекла с дальнейшей гибридизацией образцов с локус-специфическими зондами двух видов: *ETV6 Break Apart Dual Color FISH Probe* (Dako) (*ETV6 BA DC*) и *LSI TEL/AML1 Extra Signal Dual Color* (Vysis, AbbottMolecular) (*LSI TEL/AML1 ES DC*). После окончания гибридизации образцы были отмыты и проанализированы с помощью флуоресцентного микроскопа с соответствующими флуорохромами фильтрами. Анализ и регистрация результатов проводилась в соответствии с рекомендациями международной системы классификации хромосом человека ISCN 2013.

Из 90 *ETV6/RUNX1(+)* В-ОЛЛ зондом *ETV6 BA DC* был окрашен 21 случай. Данный зонд позволяет оценить только состояние гена *ETV6*, поэтому по результатам этой части исследования можно судить о вторичных явлениях в клетках, затрагивающих исключительно этот ген. В 12 случаях из 21 (57,1 %) наблюдалась делеция нетранслоцированной копии данного гена. В двух случаях (№ 75 и № 80) в одном из субклонов 3'-конец *ETV6* был дублирован. В одном случае (№ 87) в основном субклоне (83/100 проанализированных ядер) было обнаружено три копии *ETV6*, две из которых были в перестройке, что может свидетельствовать о дубликации *ETV6/RUNX1*. В одном случае (№ 69) в 3,6 % исследованных ядер была обнаружена делеция 3'-конца *ETV6*.

Зондом *LSI TEL/AML1 ES DC* удалось окрасить 73 случая из 90. 4 образца из выборки окрашивались обоими зондами (пациенты № 66–69). Данный зонд позволяет оценить состояния всех копий генов *ETV6* и *RUNX1*. Потеря нетранслоцированной копии гена *ETV6* обнаруживалась в 79,5 % (58/73) случаев и являлась наиболее часто встречающимся вторичным изменением. В 20 случаях из 73 (27,4 %) было выявлено наличие дополнительной копии *RUNX1*. Одновременно среди субклонов две вышеуказанные аномалии присутствовали в 20,5 % (15/73) случаев. В 5 случаях из 73 (6,8 %) была обнаружена потеря *RUNX1*, и процент такого субклона среди общего количества подсчитанных клеток варьировал в очень широких пределах (8,0 %, 10,0 %, 19,6 %, 39,0 %, 81,2 %). При рассмотрении данной аномалии следует обратить внимание на особенность зонда *LSI TEL/AML1 ES DC*, которая заключается в наличии красного эктра сигнала при транслокации *ETV6/RUNX1*, который соответствует нетранслоцированному остаточному 5'-концу *RUNX1*. Эктра сигнал меньше по размеру, чем неабберрантная копия гена *RUNX1*, однако при анализе при помощи микроскопа эти два сигнала довольно проблематично отличить между собой. На основании полученных данных сложно сказать, имела ли место делеция нетранслоцированной копии *RUNX1* или же делеция остаточного 5'-конца. Не исключено, что такой набор сигналов может быть результатом не очень хорошо прошедшей покраски (при небольшом проценте клеток в образце), или же колокализации сигналов *ETV6* и *RUNX1*, процент которой для данного типа зонда в некоторых случаях может быть весьма велик. В 4 случаях из 73 (5,5 %) был обнаружен субклон, содержащий дополнительную копию гена *ETV6*. Только в одном случае процент содержания субклона с эктра копией *ETV6* среди проанализированных ядер составил 16,7 % (15/90), еще в трех случаях содержание клеток с данной аномалией составило не более 4 %.

Сравнив данные полученные при анализе 4 случаев, окрашенных двумя зондами, мы получили в целом схожие результаты относительно содержания субклонов, имеющих транслокацию *ETV6/RUNX1*. Однако в одном случае (пациент № 67) при покраске зондом *LSI TEL/AML1 ES DC* было выявлено 8,9 % интерфазных ядер, в которых была делетирована нетранслоцированная копия *ETV6*, чего зондом *ETV6 BA DC* обнаружено не было. При анализе клеточного материала пациента № 69, окрашенного зондом *LSI TEL/AML1 ES DC*, была выявлена делеция интактной копии *ETV6* в 4 % случаев, которую при окраске зондом *ETV6 BA DC* выявить не удалось. Однако, в 3,6 % случаев данный зонд показал делецию 3'-конца гена *ETV6*. Также в случае № 69 8 % проанализированных ядер содержали делецию копии *RUNX1*.

В нашем исследовании мы выявили потерю нетранслоцированной копии гена *ETV6* в 69 случаях (76,7 %) из 90 с *ETV6/RUNX1*-позитным В-ОЛЛ, что подтверждает литературные данные о частоте встречаемости данной аберрации (76,7 vs. 75 %). Это еще раз свидетельствует в пользу гипотезы о том, что ген *ETV6* является опухолевым супрессором и его инактивация может приводить к малигнизации клеток.

Так же был выявлен ряд других аномалий, наиболее часто встречающейся из которых была дополнительная копия *RUNX1* (26,0 %, 19/73). В зависимости от того, в каком клоне (минорном, основном) выявляется аберрация можно предполагать ее роль в лейкемогенезе и/или прогрессии заболевания. Как пример, делеция *RUNX1* выявлялась от 8 до 81,2 %, что может означать как ее важную роль в прогрессии заболевания, так и не иметь значимой биологической функции, что требует дополнительного изучения.

Подводя итоги данного исследования важно заметить, что 78 из 90 (86,7 %) проанализированных случаев, помимо t(12;21)(p13;q22), имелась хотя бы одна дополнительная хромосомная аберрация затрагивающая гены *ETV6* и *RUNX1*. Также, в 72,2 % случаев выявлялись два или более субклона лейкозных клеток, затрагивающих

интактные копии генов *ETV6* и *RUNX1*. В разных субклонах могли выявляться все вышеописанные aberrации или их сочетания.

Полученные данные по вторичным повторяющимся aberrациям генов *ETV6* и *RUNX1* в *ETV6/RUNX1(+)* В-ОЛЛ в целом соответствуют литературным данным о частоте встречаемости и их роли в прогрессии заболевания. Наиболее частой aberrацией является делеция дополнительной копии гена *ETV6*, которую считают одним из основных дополнительных изменений, необходимых для развития данного типа лейкоза. Другие количественные изменения генов *ETV6* и *RUNX1* могут выявляться при прогрессии заболевания (как гены транскрипционных факторов).

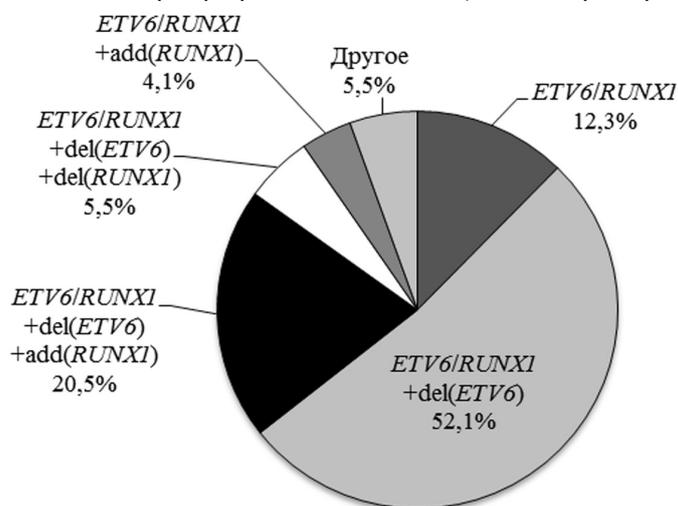


Рисунок – Распределение наиболее часто встречаемых дополнительных хромосомных aberrаций и их комбинации при *ETV6/RUNX1*-положительных В-ОЛЛ у детей

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mori, H. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development / H. Mori [et al.] // PNAS. – 2002. – Vol. 99, № 12. – P. 8242–8247.
2. Pais, A. P. *RUNX1* aberrations in *ETV6/RUNX1*-positive and *ETV6/RUNX1*-negative patients: Its hematopathological and prognostic significance in a large cohort (619 cases) of ALL / A. P. Pais [et al.] // Pediatric Hematology and Oncology. – 2008. – P. 582–597.
3. Zakaria, Z. Chromosomal aberrations in *ETV6/RUNX1*-positive childhood acute lymphoblastic leukemia using 244K oligonucleotide array comparative genomic hybridization / Z. Zakaria [et al.] // Molecular Cytogenetics. – 2012. – P. 1–6.
4. Shaffer, L. G. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013) / L. G. Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid // Basel: Cytogenetic and Genome Research. – 2013. – 140 p.

## ПОПУЛЯЦИОННАЯ ЧАСТОТА SPINA BIFIDA В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ FREQUENCY OF SPINA BIFIDA IN THE POPULATION OF THE REPUBLIC OF BELARUS

**П. Р. Калофати<sup>1</sup>, А. А. Ершова-Павлова<sup>2</sup>**  
**P. Kalofati<sup>1</sup>, A. Yershova-Pavlova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»,  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,  
г. Минск, Республика Беларусь  
apoinakalofati@gmail.com

<sup>1</sup>The Mother and Child National Research Center, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Проведен анализ данных о частоте встречаемости spina bifida в Республике Беларусь у детей за 2008–2015 гг. Ежегодно регистрируется в среднем 104 случая, популяционная частота – 0,91 ‰, эффективность пренатальной диагностики в среднем за данный период – 82,7 ‰. Объектом исследования выступали вопро-