

А.Е. Друй^{1,2,3}, Г.А. Цаур^{1,3}, Е.В.Шориков^{1,3}, А.М. Попов^{1,3}, О.М. Плеханова¹, С.Н. Тупоногов¹, Л.И. Савельев^{1,2,3}, С.В. Цвиренко^{1,2}, Л.Г. Фечина^{1,3}

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ УВЕЛИЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА КОРОТКОГО ПЛЕЧА ХРОМОСОМЫ 2 И ДЕЛЕЦИИ КОРОТКОГО ПЛЕЧА ХРОМОСОМЫ 1 У БОЛЬНЫХ НЕЙРОБЛАСТОМОЙ

¹ ГБУЗ СО Областная детская клиническая больница №1,

² ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия,

³ ГБУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург

Амплификация гена *MYCN* и делеция короткого плеча хромосомы 1 (*del1p*) в клетках нейробластомы являются неблагоприятными прогностическими признаками и используются в различных схемах стратификации пациентов на группы риска. Данные генетические aberrации определялись методами множественной лигазно-зависимой амплификации зондов (MLPA), ПЦР и FISH. Амплификация гена *MYCN* была выявлена с помощью MLPA и ПЦР у 21 пациента (17,2%). В 28 образцах (23,0%) было обнаружено увеличение генетического материала короткого плеча хромосомы 2, не достигающее порога амплификации. Делеция 1p определялась в 28 случаях из 122 (23,0%), при этом качественная однотипность результатов ПЦР и MLPA составила 95,8%, ПЦР и FISH – 90,9%. Медиана времени наблюдения за пациентами составила 42 мес. (диапазон 1 мес. – 13 лет). Показатели бессобытийной и общей выживаемости как в группе больных с амплификацией *MYCN*, так и с наличием делеции 1p были ниже, чем у пациентов с нормальным количеством копий гена *MYCN* и отсутствием делеции.

Ключевые слова: нейробластома, амплификация гена *MYCN*, делеция короткого плеча хромосомы 1

Клиническое течение нейробластомы во многом определяется биологическими свойствами клеток опухоли, варьируя в широком диапазоне от относительно доброкачественных форм с признаками дифференцировки клеточных элементов до агрессивных опухолей, сопровождаемых местным распространением и отдаленными метастазами. Неблагоприятное прогностическое значение амплификации гена *MYCN* и делеции короткого плеча хромосомы 1 было показано в большом количестве моно- и мультицентровых клинических исследований [5,6,10,12,14]. Амплификация гена *MYCN* выявляется примерно в

20-25% случаев нейробластомы, однако в ряде популяций частота ее выявления несколько ниже – около 16% [1,15]. Она ассоциирована с незрелым фенотипом опухоли, неблагоприятной гистологической категорией и высокой скоростью пролиферации клеток.

Ген *MYCN* локализуется на коротком плече хромосомы 2 (локус 2p24.3) и расположенные в данном регионе (2p24-25) гены *DDX1*, *NAG* и *ALK* также могут вовлекаться в амплификацию [11]. Прогностическое и патогенетическое значение коампликации генов *MYCN* и *DDX1*, *NAG*, *NSE1*, *LPIN1* или *ALK* остается предметом дискуссий [8,11].

Делеция короткого плеча хромосомы 1 встречается в 30-40% случаев нейробластомы и часто сочетается с амплификацией гена *MYCN* [5,12]. При возникновении данной aberrации происходит потеря гетерозиготности в локусе 1p36 [12]. К. Ohtsu и соавт. [13] показали, что при наличии терминальной делеции опухоль имела злокачественный фенотип, а общая выживаемость пациентов составила 33,3%. В то же время, между группами больных с интерстициальной (внутрихромосомной) делецией и отсутствием делеции 1p выживаемость достоверно не отличалась и составила 100% и 90,7% соответственно [13].

Для выявления мутаций, связанных с изменением количества копий генов и хромосомных регионов (делеции и амплификации) предложены различные методики: гибридизация по Саузерну, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), множественная лигазно-зависимая амплификация зондов (MLPA), сравнительная геномная гибридизация, исследование однонуклеотидных полиморфизмов [4,5]. Метод FISH в настоящее время является «золотым стандартом» определения числа копий гена *MYCN* и обнаружения делеции 1p [3]. Он позволяет дифференцировать опухолевые клетки от нормальных, одно-

временно исследовать интересующие хромосомные aberrации и ploидность изучаемых клеток. Использование метода FISH дает возможность выявить гетерогенность клеток опухоли. Так, например, разнородность по количеству копий гена *MYCN* определяется, по данным различных авторов, в 8-21% случаев нейробластомы с амплификацией *MYCN* [2,3].

Применение ПЦР позволяет быстро и точно определять количество копий гена *MYCN* и выявлять делецию 1p [4,5]. Данные, полученные с помощью FISH и ПЦР, имеют высокое качественное однообразие, кроме того, обе методики могут применяться для анализа образцов тканей, выделенных из парафиновых блоков [4,9].

Множественная лигазно-зависимая амплификация зондов (MLPA) является универсальной технологией, позволяющей выявлять генетические аномалии, связанные с изменением числа копий анализируемых хромосомных локусов. Она основана на многократном копировании лигированных олигонуклеотидных зондов, специфичных к исследуемым локусам, с помощью ПЦР. В одной реакционной смеси возможно использование до 50 зондов к различным хромосомным регионам.

Целью данной работы явилось сравнительное исследование методов ПЦР, MLPA и FISH для определения количества копий гена *MYCN* и выявления делеции 1p у пациентов с нейробластомой, а также оценки прогностической значимости выявленных aberrаций.

Пациенты и методы исследования

Определение хромосомных aberrаций (в том числе, амплификации *MYCN* и делеции 1p) методом MLPA и числа копий гена *MYCN* с помощью ПЦР-РВ было выполнено у 122 больных, находившихся на лечении в Областной детской клинической больнице №1 (г. Екатеринбург) в период с декабря 1999 г. по декабрь 2012 г. У всех больных был установлен диагноз нейробластомы различной степени дифференцировки (нейробластома – 101 пациент, ганглионейробластома – 12 пациентов) и ганглионевромы (9 пациентов). Соотношение девочек и мальчиков составило 1,4:1 (71 и 51 пациент соответственно), медиана возраста – 16,5 мес. (диапазон 0,2-180 мес.), 44,3% (54) пациентов были младше 1 года. 30,4% — 37 больных были в I стадии заболевания, 8,1% (10) – во II стадии, 18,9% (23) – в III стадии, 34,5% (42) – в IV стадии, 8,1% (10) – в стадии IVS. Выявление делеции 1p с помощью ПЦР (анализ переменного числа tandemных повторов в теломерном регионе короткого плеча хромосомы 1, VNTR) было выполнено 70 пациентам, из них 25 (35,7%) с I стадией нейробластомы, 3 (4,3%) – со II стадией, 12 (17,1%) – с III стадией, 24 (34,3%) – с IV стадией, 6 (8,6%) – со стадией IVS.

Для оценки возможности использования ДНК, выделенной из образцов ткани, фиксированной в формалине и залитой в парафиновый блок, было проанализировано 20 образцов, у 15 больных была диагностирована нейробла-

стома, у 3 – ганглионейробластома, у 2 – ганглионеврома. Распределение по стадиям заболевания было следующим: I стадия – 12 пациентов, II стадия – 2, III стадия – 2, IV стадия – 4 пациента. Трех пациентам был проведен анализ делеции 1p методом ПЦР VNTR.

Исследовалась нативная опухолевая ткань, полученная в ходе оперативного вмешательства (127 образцов), а также парафиновые блоки (20 образцов) с гистологически подтвержденным диагнозом. Также были исследованы клеточные линии нейробластомы IMR-32 (с амплификацией гена *MYCN*), Kelly (с амплификацией *MYCN* и делецией 1p) и SH-SY5Y (с нормальным количеством копий *MYCN*, без делеции 1p). В качестве контрольных образцов ткани, не имеющих исследуемых aberrаций, были использованы лейкоциты периферической крови 10 здоровых доноров (для ПЦР-РВ и MLPA), лейкоциты периферической крови или цитологически интактного костного мозга обследуемых больных нейробластомой (n=73, для ПЦР VNTR) и 5 парафиновых блоков с образцами ткани аденокарциномы легкого с верифицированным лечебным патоморфозом (для MLPA). Выделение геномной ДНК из клеточных линий, лейкоцитов и нативных образцов ткани (n=66) осуществляли либо методом фенол-хлороформной экстракции, либо с использованием коммерческого набора Wizard genomic DNA purification kit (Promega, США) (n=61). Для опухолевого материала из парафинового блока использовался набор RecoverAll Total nucleic acid isolation (Ambion, США) с предварительной депарафинизацией *o*-ксилолом. Концентрация выделенной ДНК измерялась с помощью спектрофотометрии, в последующие реакции MLPA и ПЦР вносили 100 нг геномной ДНК. Для определения количества копий гена *MYCN* использовался метод мультиплексной количественной ПЦР-РВ, который был подробно описан ранее [1].

Обнаружение и идентификация делеции 1p осуществлялись с помощью анализа переменного числа tandemных повторов в области короткого плеча хромосомы 1. Для этого ДНК из ткани опухоли вносилась в 6 мультиплексных ПЦР с использованием праймеров, специфичных к двум минисателлитным локусам (D1S76 и D1S80) и 4 микросателлитным локусам (D1S214, D1S436, D1S2663 и D1S2697). В качестве контроля проводилась ПЦР с использованием ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови или цитологически интактного костного мозга того же пациента. Детекция результатов ПЦР осуществлялась с помощью вертикального электрофореза в 10% полиакриламидном геле и электрофореза флуоресцентно-меченных ПЦР-продуктов на микроструйных ДНК-чипах (Caliper Technologies, США) с помощью прибора Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Германия). С учетом расположения потерянных локусов в составе хромосомы 1, была проведена идентификация интерстициальной и терминальной делеции 1p [5,13].

Для анализа aberrаций в клетках нейробластомы методом MLPA компанией MRC-Holland (Нидерланды) разработаны три панели зондов: SALSA P251, содержащая 34 зонда для хромосом 1, 3 и 11; SALSA P252 (33 зонда для хромосом 2 и 17); SALSA P253 (33 зонда для хромосом 4, 7, 9, 12 и 14). Каждая панель содержит 10 контрольных зондов, специфичных для регионов, в которых редко возникают делеции и амплификации при нейробластоме (регионы 5p, 6p, 15q, 16p, 16q, 19q, 20q, 21q).

В каждой постановке MLPA использовались 27 образцов ДНК из ткани опухоли пациентов и 5 образцов контрольной (неопухолевой) ДНК, выделенной тем же способом, что и исследуемая ДНК опухоли. Реакция MLPA состоит из этапов денатурации ДНК-матрицы, присоединения и лигирования 2 частей олигонуклеотидных зондов,

которые в дальнейшем подвергаются амплификации. Для детекции ампликонов применялся капиллярный электрофорез с помощью генетического анализатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США).

При анализе результатов MLPA рассчитывается величина соотношения (BC) относительного количества каждого амплифицированного зонда в исследуемом образце к усредненному количеству аналогичного зонда в референсных образцах того же эксперимента. Европейская группа по исследованию нейробластомы SIOPEN сформулировала критерии для интерпретации результатов MLPA. При отсутствии aberrаций, связанных с изменением числа копий анализируемого региона значение BC составляет от 0,75 до 1,25. Оно одинаково для зондов специфичных к обоим плечам исследуемой хромосомы, а также для контрольных зондов. В случае гетерозиготной делеции происходит снижение BC как минимум для 2 смежных зондов до значений 0,5-0,75. При гомозиготной делеции сигнал от зондов исследуемого региона отсутствует. Увеличение BC сигналов от более чем 2 смежных зондов до значений 1,5-3,0 оценивается как увеличение генетического материала анализируемого региона, а при выявлении значения более 3,0 делается вывод о наличии амплификации. В то же время, увеличение или уменьшение BC сигналов от одного зонда, при условии нормальных значений BC для рядом расположенных зондов, игнорируется. [3].

Определение амплификации гена *MYCN* и делеции 1p методом FISH было выполнено 22 больным с морфологически верифицированным диагнозом нейробластомы. Анализировались мазки-отпечатки ткани, сделанные из двух и более участков опухоли. Для проведения исследования количества копий *MYCN* использовались наборы флуоресцентных зондов Vysis LSI N-MYC (2p24) SpectrumGreen/CEP 2 SpectrumOrange Probe (Abbott Molecular, США) и N-MYC Amplification LPS 009 (Cytocell, Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя. Для выявления делеции 1p применялся набор флуоресцентных зондов Vysis 1p36 Microdeletion Region Probe – LSI p58 (1p36) (SpectrumOrange)/TelVysion 1p (SpectrumGreen)/LSI 1q25 (SpectrumAqua).

Во всех 122 образцах, исследованных с помощью MLPA, количество копий гена *MYCN* было определено с использованием ПЦР-РВ, в 73 из них осуществлялся анализ делеции 1p методом ПЦР VNTR. Кроме того, в 22 образцах поиск исследуемых aberrаций проспективно был осуществлен методом FISH. Применение нескольких методик позволило оценить однотипность результатов используемых технологий.

Сравнение количественных характеристик проводилось, используя критерий χ^2 с поправкой Йетса. Анализ общей и бессобытийной выживаемости больных проводился с помощью Log-Rank теста. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Для статистической обработки данных использовались программы Statistica 8.0 и Biostat, для анализа результатов MLPA – Coffalyser.

Результаты исследования

Определение количества копий гена *MYCN*

При анализе образцов клеточных линий IMR-32 и Kelly с помощью ПЦР-РВ выявлена амплификация гена *MYCN* (56 и 588 копий соответственно). В клетках SH-SY5Y, а также в образцах лейкоцитов периферической крови здоровых доноров было обнаружено нормальное количество копий *MYCN* равное 2. Амплификация гена *MYCN* определялась у 21 (17,2%) из 122 па-

циентов, обследованных методом ПЦР-РВ, при этом количество копий находилось в диапазоне от 8 до 216 (медиана 46).

Метод MLPA позволил разделить обследованных пациентов на несколько групп в зависимости от количества копий гена *MYCN* и генов, картированных в данном (2p24.3) и смежных локусах. В случае если значение BC в исследуемом образце составляло более 3, делался вывод о наличии амплификации гена *MYCN* самостоятельно или совместно с генами *NAG*, *DDX1*, *ALK*. О наличии увеличения генетического материала анализируемого региона, не достигающего порога амплификации, свидетельствовали значения BC от 1,5 до 3,0. При этом были выделены 2 типа увеличения генетического материала короткого плеча хромосомы 2 (2p). При типе 1 происходит увеличение числа копий крупного региона короткого плеча хромосомы 2 от локуса 2p23.2 до теломерной области, что выражается в увеличении BC для зондов, специфичных для генов *ALK*, *MYCN*, *DDX1*, *NAG*, *TPO* и *TMEM18*. При типе 2 происходит увеличение BC для зондов, связывающихся с геном *MYCN* и генами, подвергающимися коампликации с ним. Из 122 обследованных больных амплификация гена *MYCN* была выявлена у 21 (17,2%). При этом у 9 (7,4%) больных определялась амплификация только гена *MYCN*, у 5 (4,1%) – *MYCN* и *DDX1*, у 4 (3,3%) – *MYCN*, *NAG* и *DDX1*, у 2 (1,6%) – *MYCN* и *ALK*, у 1 (0,8%) – *MYCN*, *DDX1* и *ALK*. Увеличение генетического материала короткого плеча хромосомы 2 первого типа было отмечено у 13 пациентов (10,7%), второго типа – у 15 (12,3%).

В клетках линии Kelly с помощью MLPA была выявлена амплификация гена *MYCN*, в клетках IMR-32 – коамплификация генов *MYCN*, *DDX1* и *NAG*, а в образце SH-SY5Y – нормальное количество копий *MYCN*. При определении количества копий гена *MYCN* методом FISH, амплификация была выявлена у 6 из 22 обследованных пациентов. При этом у данных больных амплификация гена *MYCN* была выявлена как с помощью ПЦР-РВ, так и с помощью MLPA. Оба метода дали возможность обнаружить амплификацию гена *MYCN* у 21 пациента, однако метод ПЦР-РВ не позволил выявить наличие увеличения материала короткого плеча хромосомы 2, не достигающего порога амплификации. Во всех случаях увеличения материала 2p, детектированного MLPA, было определено нормальное количество копий гена *MYCN* методом ПЦР-РВ. Сопоставление результатов определения количества копий гена *MYCN* с помощью MLPA и ПЦР-РВ приведено в таблице 1.

Таблица 1. Сопоставление результатов определения количества копий гена MYCN с помощью MLPA и ПЦР-РВ

ПЦР-РВ	MLPA		
	Амплификация	Увеличение материала 2p (тип 1 и 2)	Нормальное количество копий
Амплификация	21	0	0
Нормальное количество копий	0	28	73
	p<0,001		

Наибольшее количество пациентов с амплификацией гена MYCN и увеличением генетического материала 2p было отмечено среди больных с IV стадией нейробластомы – 22 из 42 (табл. 2). В то же время данные aberrации были обнаружены и у пациентов с наиболее благоприятными стадиями заболевания – I и IVS (14 из 33).

Во всех случаях, где была выявлена амплификация гена MYCN, гистологическим вариантом опухоли являлась нейробластома. В образцах, морфологически интерпретированных как ганглионеврома и ганглионейробластома, амплификация MYCN отсутствовала, однако у 6 пациентов было обнаружено увеличение материала короткого плеча хромосомы 2. Также распределение больных по количеству копий гена MYCN достоверно различалось в зависимости от возраста пациентов на момент постановки диагноза. Только у 3 из 54 обследованных пациентов младше 12 мес. была выявлена опухоль, состоящая из клеток с амплификацией гена MYCN (табл.2).

Таблица 2. Распределение больных в соответствии с количеством копий MYCN в зависимости от стадии заболевания, морфологического диагноза и возраста на момент постановки диагноза

Показатели	Амплификация	Увеличение материала 2p		Нормальное количество копий
		Тип 1	Тип 2	
Стадия				
I	2	3	6	26
II	1	2	0	7
III	5	1	4	13
IV	12	7	3	20
IVS	1	0	2	7
	p=0,002			
Диагноз				
Ганглионеврома	0	1	1	7
Ганглионейробластома	0	0	4	8
Нейробластома	21	12	10	58
	p=0,024			
Возраст				
Младше 12 мес.	3	6	9	36
Старше 12 мес.	18	7	6	37
	p=0,025			

Медиана времени наблюдения за больными составила 42 мес. (диапазон от 1 мес. до 13 лет). Бессобытийная выживаемость (БСВ) в группе пациентов с амплификацией MYCN была достоверно ниже, чем у пациентов с нормальным количеством копий гена MYCN (0,18±0,10 и 0,62±0,08 соответственно, p<0,001). Общая выживаемость (ОВ) в группе с амплификацией гена MYCN также была ниже, по сравнению с больными, имеющими опухоль с нормальным количеством копий исследуемого гена: 0,25±0,11 и 0,72±0,07 соответственно (p<0,001). Бессобытийная и общая выживаемость пациентов, имеющих амплификацию только гена MYCN, и коамплификацию MYCN с одним или несколькими генами региона 2p24, между собой достоверно не отличалась (БСВ: 0,29±0,22 и 0,19±0,12, p=0,979; ОВ: 0,21±0,19 и 0,29±0,13, p=0,805, соответственно). Также не было отмечено достоверных различий уровней бессобытийной и общей выживаемости в группах больных с увеличением генетического материала 1 типа (БСВ: 0,39±0,16, ОВ: 0,50±0,15), 2 типа (БСВ: 0,59±0,16, ОВ: 0,74±0,17) и не имеющих aberrаций короткого плеча хромосомы 2 (БСВ: 0,62±0,08, ОВ: 0,72±0,07).

Выявление делеции короткого плеча хромосомы 1

Выявление делеции короткого плеча хромосомы 1 методом MLPA основано на обнаружении уменьшения ВС зондов, специфичных к регионам 1p35-1p36, что позволяет различать интерстициальные и терминальные делеции. Делеция 1p была обнаружена у 28 из 122 обследованных пациентов (23,0%) и только в одном случае (0,8%) являлась интерстициальной. В 7 случаях в зону терминальной делеции попадал локус 1p35. В образцах клеточной линии IMR-32 была выявлена терминальная делеция локуса 1p36, в клетках Kelly терминальная делеция включала локусы 1p32-1p36 и наблюдалась на фоне трисомии хромосомы 1. В клеточной линии SH-SY5Y делеция 1p не определялась.

С целью изучения возможности использования ДНК, выделенной из ткани, фиксированной в формалине и залитой в парафин, для последующего исследования методом MLPA, проанализированы 20 образцов с использованием набора зондов SALSA P251 (включающего зонды к локусам хромосомы 1). В силу высокой степени фрагментации выделенной ДНК, 7 образцов оказались непригодными для проведения анализа. В 3 из 13 проанализированных образцов была выявлена терминальная делеция 1p.

Исследование делеции 1p с помощью анализа вариабельности tandemных повторов (VNTR) в теломерном регионе короткого плеча хромосо-

мы 1 было проведено у 73 пациентов. При этом делеция была обнаружена у 9 (12,3%) больных и во всех случаях являлась терминальной. У 3 пациентов исходным материалом служила ткань опухоли из парафинового блока, качество выделенной ДНК было достаточным для проведения исследования методом ПЦР VNTR. Все больные, исследованные с помощью данной методики, были тестированы с использованием MLPA, что дало возможность сравнить результаты 2 технологий (табл. 3).

В 2 случаях, когда методом MLPA была выявлена делеция 1p, ПЦР VNTR выявила наличие гомозиготного состояния в 2 терминальных минисателлитных локусах, наиболее часто вовлекаемых в делецию, что сделало невозможным корректную интерпретацию результатов. Данным пациентам исследование методом FISH не проводилось. Метод FISH позволил обнаружить делецию 1p у 3 из 22 пациентов, у 2 из них результат был подтвержден с помощью MLPA и ПЦР VNTR (табл. 3). Один пациент был негативен по данным FISH и MLPA, однако у него была обнаружена делеция 1p методом ПЦР.

Таблица 3. Сопоставление результатов определения делеции 1p помощью MLPA, FISH и ПЦР VNTR

Метод и генетическая поломка		MLPA		ПЦР VNTR	
		Делеция 1p	Норма	Делеция 1p	Норма
FISH	Делеция 1p	2	1	2	1
	Норма	0	19	1	18
		p=0,008		p=0,048	
ПЦР VNTR	Делеция 1p	9	1		
	Норма	2	59		
		p<0,001			

В дальнейшем, решение в пользу наличия у пациента делеции 1p принималось в том случае, если она была выявлена хотя бы одним из трех методов. Таким образом, из 135 обследованных пациентов делеция была выявлена у 33 (24,4%). Большинство пациентов, у которых была обнаружена делеция 1p, имели IV стадию нейробластомы, хотя различия не достигли статистической значимости, и данная абберрация встречалась при всех стадиях заболевания (табл. 4). Делеция 1p выявлялась при всех морфологических вариантах опухоли вне зависимости от степени злокачественности. Она обнаруживалась как в образцах доброкачественных ганглионевром, так и в случаях злокачественных нейробластом. Количество больных, имеющих делецию 1p, различалось в зависимости от возраста на момент постановки диагноза, большинство пациентов были старше 12 месяцев (табл. 4).

Таблица 4. Распределение больных в соответствии с наличием делеции 1p в зависимости от стадии заболевания, морфологического диагноза и возраста на момент постановки диагноза

Стадия	Делеция 1p	Норма
I	6	38
II	4	8
III	5	18
IV	17	29
IVS	1	9
p=0,077		
Диагноз		
Ганглионеврома	3	8
Ганглионейробластома	1	14
Нейробластома	29	80
p=0,236		
Возраст		
Младше 12 мес.	9	50
Старше 12 мес.	24	52
p=0,047		

Бессобытийная выживаемость в группе пациентов наличием делеции 1p была ниже, чем у пациентов без делеции ($0,21 \pm 0,11$ и $0,61 \pm 0,07$ соответственно, $p=0,003$). Общая выживаемость в группе с делецией 1p также была ниже, по сравнению с больными, не имеющими данной абберрации: $0,38 \pm 0,10$ и $0,73 \pm 0,05$ соответственно ($p=0,003$). Наличие делеции 1p приобретает важное прогностическое значение в случаях отсутствия амплификации гена *MYCN* [12,14]. Из 122 обследованных было выявлено 15 таких пациентов, еще в 15 случаях обе анализируемые абберрации сочетались (табл. 5).

Таблица 5. Распределение больных по результатам выявления делеции 1p и амплификации гена MYCN

		Количество копий MYCN	
		Амплификация	Норма
Делеция 1p	Обнаружена	15	15
	Не обнаружена	6	85
		p<0,001	

При анализе общей и бессобытийной выживаемости среди пациентов с отсутствием амплификации гена *MYCN*, в группе пациентов с делецией 1p оба показателя были достоверно ниже по сравнению с группой больных, у которых делеция 1p выявлена не была (ОВ: $0,44 \pm 0,14$ и $0,77 \pm 0,05$ $p=0,041$; БСВ: $0,26 \pm 0,14$ и $0,65 \pm 0,07$ $p=0,030$). В группе больных с амплификацией гена *MYCN* наличие делеции 1p не оказывало влияния на выживаемость пациентов.

Обсуждение

Современные схемы стратификации больных нейробластомой на группы риска включают исследование молекулярно-биологических свойств опухолевых клеток. Неблагоприятное прогностическое значение амплификации гена *MYCN* и делеции короткого плеча хромосомы 1 было показано в большом количестве исследований [5,12] и нашло подтверждение в настоящей работе. Этим обусловлена необходимость своевременного и корректного определения данных аберраций до начала лечения для выбора оптимальной интенсивности терапии. Наиболее широко используемая в нашей стране схема программной химиотерапии нейробластомы NB2004 классифицирует больных с наличием амплификации *MYCN* как пациентов группы высокого риска вне зависимости от стадии заболевания и возраста. Наличие делеции 1p учитывается при стратификации больных локализованной нейробластомой (II, III стадии) и увеличивает риск у данных пациентов с низкого до среднего.

Проанализированные методы, используемые для выявления амплификации *MYCN* и делеции 1p, продемонстрировали ряд достоинств и недостатков. Методики, основанные на технологии ПЦР, просты в использовании, они позволяют быстро (в течение 3-4 час.) и точно определить наличие аберраций, результаты обладают высокой воспроизводимостью. Однако метод ПЦР не позволяет выявить увеличения количества копий гена *MYCN*, не достигающего порога амплификации. Определение делеции 1p с помощью ПЦР требует наличия ДНК, выделенной из неопухолевого материала того же пациента. Метод FISH на сегодняшний день признан «золотым стандартом» для диагностики аберраций, ассоциированных с изменением числа копий отдельных генов. Он также дает возможность получить точный результат за короткое время наряду с оценкой ploидности опухолевых клеток. Для анализа как методом FISH, так и ПЦР может быть применена ткань опухоли, фиксированная в формалине и залитая в парафин, что дает возможность для ретроспективного анализа архивных образцов.

Метод MLPA позволяет одновременно определять большое количество аберраций, связанных с изменением числа копий отдельных генов или хромосомных регионов, включая делецию 1p и различные варианты изменения количества копий *MYCN*. Так же как и ПЦР, данный метод требует использования небольшого количества опухолевой ДНК – не более 100 нг. Результаты, полученные с помощью MLPA, обладают высокой воспроизводимостью. В то

же время, метод MLPA может быть применен в рутинной клинической практике ограниченно, так как исследование единичного образца данным методом не имеет диагностической значимости. Решающее значение приобретает расчет ВС сигнала каждого зонда в анализируемом образце к усредненной величине сигнала аналогичного зонда в референсных образцах. Это требует включения в одну постановку нескольких исследуемых и референсных образцов. Кроме того, использование материала из парафинового блока возможно, но крайне нежелательно из-за высокой степени фрагментации выделенной ДНК. По нашим данным, только 13 из 20 включенных образцов были приемлемы для анализа.

Все анализируемые методы показали высокую эффективность при выявлении амплификации *MYCN*. В клеточных линиях, имеющих амплификацию, она была обнаружена как ПЦР-РВ, так и MLPA, а в донорских лейкоцитах и клетках SH-SY5Y было определено нормальное количество копий гена *MYCN*. При анализе образцов пациентов в 21 случае была определена амплификация *MYCN*, при этом результаты MLPA, ПЦР-РВ и FISH подтверждали друг друга. Результаты MLPA показали, что только в 9 случаях ген *MYCN* был амплифицирован самостоятельно, тогда как в 12 происходила коамплификация *MYCN* с генами *NAG*, *DDX1* или *ALK*. Амплификация *MYCN* сочеталась с другими неблагоприятными прогностическими признаками: наиболее часто она выявлялась у пациентов с IV стадией заболевания и неблагоприятным гистологическим строением опухоли. В образцах ганглионевромы и ганглионейробластомы она не выявлялась ни в одном случае. У больных, старше 12 мес., имеющих худший прогноз по сравнению с пациентами, младше 12 мес. [7], амплификация *MYCN* выявлялась достоверно чаще.

В то же время метод MLPA позволил выявить 28 пациентов, у которых количество копий гена *MYCN* было увеличенным, но не достигало порога амплификации. У данных больных с помощью ПЦР-РВ было определено нормальное количество копий *MYCN*. Тип 1 увеличения материала 2p, который рассматривается как сегментарная хромосомная аберрация, не влияющая на прогноз нейробластомы, был выявлен у 13 больных. Тип 2, обнаруженный у 15 пациентов, обусловлен гетерогенностью клеток внутри опухоли или разведением неопухолевой ДНК при наличии клеток, несущих амплификацию *MYCN*, что может ухудшать прогноз заболевания [3].

При анализе общей и бессобытийной выживаемости были выявлены достоверные разли-

чия между больными с наличием и отсутствием амплификации *MYCN*. Пациенты с нормальным количеством копий гена имели более высокие значения долгосрочной выживаемости, тогда как неблагоприятные события встречались у них значительно реже, чем у больных с амплификацией *MYCN*. Наличие коампликации гена *MYCN* с генами *NAG*, *DDX1* или *ALK* не оказывало влияния на показатели выживаемости по сравнению с наличием амплификации только *MYCN*.

Делеция короткого плеча хромосомы 1 была выявлена у 33 пациентов, при этом у 1 больного она определялась только с помощью ПЦР, а еще у 1 – только с помощью FISH. Качественная однотипность методов MLPA и ПЦР составила 95,8%, а MLPA и FISH – 95,5%. Только в 1 случае из 33 выявленная делеция являлась интерстициальной. Гомозиготное состояние локусов, анализируемых методом VNTR, является ограничением для применения данного метода. У 2 пациентов гомозиготное состояние 2 терминально расположенных минисателлитных локусов (D1S76 и D1S80) не позволило выявить делецию 1p, обнаруженную только с помощью MLPA.

Частота выявления делеции 1p не зависела от стадии нейробластомы и гистологического варианта строения опухоли. Она была обнаружена в 3 образцах доброкачественной ганглионевромы. В то же время у пациентов старше 12 мес. делеция 1p выявлялась достоверно чаще. Показатели общей и бессобытийной выживаемости пациентов при наличии делеции 1p были значительно ниже, чем при ее отсутствии, что подтверждает значение данной аберрации как независимого неблагоприятного прогностического фактора.

Наличие делеции 1p приобретает важное клиническое значение для стратификации пациентов в случае отсутствия амплификации *MYCN*, что было выявлено у 15 пациентов. Величины общей и бессобытийной выживаемости у таких пациентов были достоверно ниже по сравнению с больными, у которых делеция 1p и амплификация гена *MYCN* обнаружены не были.

ЛИТЕРАТУРА

1. Друй А.Е., Цаур Г.А., Семенихина Е.Р. и др. Амплификации гена *MYCN* при нейробластоме. Методы выявления и прогностическое значение // Мед. генетика. – 2012. – № 9. – С. 25-30.

2. Ambros P.F., Ambros I.M., Kerbl R. et al. Intratumoural heterogeneity of 1p deletions and *MYCN* amplification in neuroblastomas // Med Pediatr Oncol. – 2001. – Vol. 36. – P. 1–4.
3. Ambros I.M., Brunner B., Aigner G. et al. A Multilocus Technique for Risk evaluation of patients with neuroblastoma // Clin Cancer Res. – 2011. – Vol. 17. – P. 792-804.
4. Anderson J, Gibson S, Williamson D. et al. Rapid and accurate determination of *MYCN* copy number and 1p deletion in neuroblastoma by quantitative PCR / Pediatr Blood Cancer. — 2006. – Vol. 46. – P. 820-824.
5. Attiyeh E.F., London W.B., Moss Y.P. et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma // N Engl J Med. – 2005. – Vol. 353. – P. 2243-2253.
6. Brodeur G.M., Seeger R.C., Schwab M. et al. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage // Science. – 1984. – Vol. 224. – P. 1121-1124.
7. Evans A.E., Gerson J., Schnauffer L. Spontaneous regression of neuroblastoma // Natl Cancer Inst Monogr. – 1976. – Vol. 44. – P. 49-54.
8. George R.E., Kenyon R., McGuckin A.G. et al. Analysis of candidate gene co-amplification with *MYCN* in neuroblastoma // Eur J Cancer. – 1997. – Vol. 33. – P. 2037-2042.
9. Layfield L.J., Willmore-Payne C., Shimada H, Holden J.A. Assessment of *NMYC* amplification: a comparison of FISH, quantitative PCR monoplexing and traditional blotting methods used with formalin-fixed, paraffin-embedded neuroblastomas // Anal Quant Cytol Histol, 2005. – Vol. 27. – P. 5-14.
10. Look A.T., Hayes F.A., Shuster J.J. et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study // J Clin Oncol. – 1991. – Vol. 9. – P. 581-591.
11. Manohar C.F., Salwen H.R., Brodeur G.M., Cohn S.L. Co-amplification and concomitant high levels of expression of a DEAD box gene with *MYCN* in human neuroblastoma // Genes Chromosomes Cancer. – 1995. – Vol. 14. – P. 196-203.
12. Maris J.M., White P.S., Beltinger C.P. et al. Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma // Cancer Res. – 1995. – Vol. 55. – P. 4664-4669.
13. Ohtsu K., Hiyama E., Ichikawa T. et al. Clinical investigation of neuroblastoma with partial deletion in the short arm of chromosome 1 // Clin Cancer Res. – 1997. – Vol. 3. – P. 1221-1228.
14. Simon T., Spitz R., Faldum A. et al. New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p and *MYCN* status // J Pediatr Hematol Oncol. – 2004. – Vol. 26. – P. 791-796.
15. Tonini G.P., Boni L., Pession A. et al. *MYCN* oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children // J Clin Oncol. – 1997. – Vol. 15. – P. 85-93.

*A.E.Drui^{1,2,3}, G.A.Tasaur^{1,3}, E.V.Shorikov^{1,3},
A.M.Popov^{1,3}, O.M.Plekhanova¹, S.N.Tuponogov¹,
L.I.Saveliev^{1,2,3}, S.V.Tsvirenko^{1,2}, L.G.Fechina^{1,3}*

**Methods of detection and prognostic
significance of genetic material increase of the
short arm of chromosome 2 and a deletion of
the short arm of chromosome 1 in patients
with neuroblastoma**

¹ Regional Children's Clinical Hospital № 1

² Ural State Medical Academy

³ Institute of Medical Cell Technologies
Ekaterinburg

MYCN gene amplification and 1p deletion in neuroblastoma patients are associated with poor prognosis and commonly used for patient's stratification into risk groups. *MYCN* copy number and 1p deletion status were analyzed with multiplex ligase-dependent probe amplification (MLPA), PCR and FISH. *MYCN* amplification was revealed in 21 patients (17.2%) simultaneously by MLPA and PCR. In 28 cases (23.0%) 2p gain was detected. 1p deletion was revealed in 28 patients (23.0%) while concordance between PCR and MLPA achieved 95.8%, PCR and FISH – 90.9%. Mean follow-up time achieved 42 months (ranged from 1 month to 13 years). Event-free survival and overall survival in *MYCN*-amplified patients as well as in patients with 1p deletion were significantly lower comparing with *MYCN*-negative patients or patients without 1p deletion.

Проступила в редакцию 04.04.2013