

Первичная диагностика и оценка минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни путем определения перестройки *c-MYC-IgH* с помощью полимеразной цепной реакции длинных фрагментов при лимфоме/лейкозе Беркитта

В.А.Лавриненко, Е.В.Волочник, А.С.Фёдорова, О.В.Алейникова

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии
Минздрава Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь

Целью исследования явились определение перестройки *c-MYC-IgH* с помощью полимеразной цепной реакции длинных фрагментов (ПЦР-ДФ) для диагностики лимфомы/лейкоза Беркитта, сравнение результатов ПЦР-ДФ с цитогенетическими методами, а также оценка возможности использования ПЦР-ДФ для анализа минимальной диссеминированной (МДБ) и минимальной остаточной болезни (МОБ). Обследованы 55 пациентов в возрасте от 2 до 23 лет с лимфомой/лейкозом Беркитта, перестройка *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ была выявлена у 35 (63,6%) пациентов. Проведение ПЦР-ДФ возможно у всех пациентов в отличие от G-окрашивания, однако *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ была выявлена только у 27 (71,1%) из 38 пациентов с цитогенетически подтвержденной транслокацией t(8;14)(q24;q32). ПЦР-ДФ позволила выявить перестройку *c-MYC-IgH* у 2 (40%) из 5 пациентов, у которых ее не удалось выявить с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence in situ hybridization – FISH). Комбинация методов позволила выявить перестройки гена *c-MYC* у 52 (94,5%) пациентов. МДБ с помощью ПЦР-ДФ была выявлена у 11,1% пациентов с III стадией лимфомы Беркитта и у всех пациентов с IV стадией лимфомы Беркитта, в том числе и без морфологического поражения костного мозга. ПЦР-ДФ может быть использована для первичной дифференциальной диагностики лимфомы/лейкоза Беркитта, а также для определения МДБ. При этом для оценки МОБ данный метод малоинформативен из-за невысокой чувствительности и получения только качественных результатов.

Ключевые слова: диагностика, лимфома/лейкоз Беркитта, минимальная диссеминированная болезнь, минимальная остаточная болезнь, перестройка *c-MYC-IgH*, полимеразная цепная реакция длинных фрагментов

Для цитирования: Лавриненко В.А., Волочник Е.В., Фёдорова А.С., Алейникова О.В. Первичная диагностика и оценка минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни путем определения перестройки *c-MYC-IgH* с помощью полимеразной цепной реакции длинных фрагментов при лимфоме/лейкозе Беркитта. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2016; 15(4): 66–73. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-4-66-73

Primary diagnostics and assessment of minimal disseminated and minimal residual disease in Burkitt lymphoma/leukemia by detection of *c-MYC-IgH* rearrangements with long-distance polymerase chain reaction

V.A.Lavrinenko, E.V.Volochnik, A.S.Fedorova, O.V.Aleinikova

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

The aim of this study was to identify *c-MYC-IgH* with long-distance polymerase chain reaction (LD-PCR) for Burkitt's lymphoma/leukemia diagnosis, to compare LD-PCR with cytogenetic methods and to evaluate the possibility of LD-PCR application for minimal disseminated (MDD) and minimal residual disease (MRD) detection. *c-MYC-IgH* rearrangements were detected in

Для корреспонденции:

Лавриненко Виктория Александровна, аспирант, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Минздрава Республики Беларусь

Адрес: 223053, Республика Беларусь, Минская область, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43

Телефон: (375-17) 265-4222

E-mail: lavrinenkovictoria@gmail.com

Статья поступила 04.05.2016 г., принята к печати 22.12.2016 г.

For correspondence:

Victoria A. Lavrinenko, Molecular Genetic Laboratory, Scientific Department, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology

Address: 43, Frunzenskaya street, Broylyany village, Minsk Region, 223053, Republic of Belarus

Phone: (375-17) 265-4222

E-mail: lavrinenkovictoria@gmail.com

The article was received 04.05.2016, accepted for publication 22.12.2016

63,6% of the 55 patients at the age 2–23 years. In comparison to G-banding, LD-PCR was possible to perform for all patients, however LD-PCR detected *c-MYC-IgH* only in 71,1% of the patients with translocation $t(8;14)(q24;q32)$. *c-MYC-IgH* rearrangements were found by LD-PCR in 2 of 5 (40%) of patients who were negative by FISH and G-banding. Combination of these methods allowed to reveal of *c-MYC* rearrangements in 94,5% of the patients. MDD was identified in 11,1% patient with stage III and in all patients with stage IV both negative and positive by standard morphological analysis. LD-PCR could be used for primary diagnosis of Burkitt's lymphoma/leukemia and MDD detection. At the same time, LD-PCR is less informative for MRD evaluation because of low sensitivity and possibility to obtain only qualitative results.

Key words: *diagnosis, Burkitt's lymphoma/leukemia, c-MYC-IgH rearrangement, long-distance polymerase chain reaction, minimal disseminated disease, minimal residual disease*

For citation: Lavrinenko V.A., Volochnik E.V., Fedorova A.S., Aleinikova O.V. Primary diagnostics and assessment of minimal disseminated and minimal residual disease in Burkitt lymphoma/leukemia by detection of *c-MYC-IgH* rearrangements with long-distance polymerase chain reaction. *Vopr. gematol./onkol. immunopatol. pediatri. (Pediatric Haematology/ Oncology and Immunopathology)*. 2016; 15(4): 66–73. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-4-66-73

Лимфома Беркитта встречается у детей чаще других вариантов неходжкинских лимфом (НХЛ) и в ряде регионов составляет более 50% в структуре НХЛ [1, 2]. Лимфома Беркитта представляет собой высокозлокачественную опухоль из клеток герминативного центра фолликулов и фенотипически характеризуется экспрессией CD19, CD20 и моноклонального поверхностного иммуноглобулина (Ig) M. Лейкоз Беркитта с морфологией бластных клеток L3 по FAB-классификации составляет около 1–2% от острых лимфобластных лейкозов у детей [3]. Современные протоколы стратифицированной интенсивной полихимиотерапии позволяют вылечить до 90% пациентов с лимфомой Беркитта и более 70% пациентов с лейкозом Беркитта, нивелируя прогностическую значимость практически всех известных клинических факторов [3–6]. Прогрессирование или ранний рецидив развивается менее чем у 10% пациентов, и единственным шансом на излечение является проведение аутологичной или аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в кратчайшие сроки после достижения клинического ответа на противорецидивную терапию [7]. В связи с этим поиск ранних предикторов рефрактерного течения или развития рецидива при лейкозе/лимфоме Беркитта остается актуальным.

В некоторых исследованиях показано неблагоприятное прогностическое значение наличия минимальной диссеминированной (МДБ) и/или минимальной остаточной болезни (МОБ) при лимфоме/лейкозе Беркитта [6, 8, 9]. Для определения МДБ/МОБ используют различные молекулярно-генетические методы: полимеразную цепную реакцию (ПЦР) слитных/перестроенных генов и/или их транскриптов, а также определение клональных перестроек генов Ig и T-клеточных рецепторов [6, 10]. При этом в качестве маркера МОБ необходимо использовать наиболее чувствительную и специфичную мишень, которая не должна изменяться во время проведения химиотерапии и при рецидиве.

Лимфома/лейкоз Беркитта у детей характеризуется высокой частотой хромосомных нарушений. При типичном варианте практически всегда, а при атипичном варианте примерно в 80–90% случаев выявляется транслокация между протоонкогеном *c-MYC* (8q24) и одной из цепей гена Ig. Чаще всего, примерно в 75% случаев, выявляется транслокация $t(8;14)(q24;q32)$, при которой ген *c-MYC* (8q24) переносится на тяжелую цепь гена IgH (14q32) в обратной ориентации и попадает под влияние энхансера транскрипции гена IgH. Транслокации с вовлечением легкой цепи Ig κ (2p11) или λ (22q11) встречаются значительно реже (в 11–15 и 5% слу-

чаев соответственно) [11–16]. В результате хромосомной aberrации происходит увеличение экспрессии гена *c-MYC*, в норме участвующего в регуляции передачи сигналов, клеточного цикла, метаболизма, клеточной дифференцировки и апоптоза, что приводит к неконтролируемой клеточной пролиферации [1, 17].

Рекомбинация происходит только на уровне ДНК, таким образом при перестройке *c-MYC-IgH* не образуется химерный транскрипт (мРНК) и белок. Положения точек разрыва в гене *c-MYC* и гене IgH очень рассеяны, поэтому для определения *c-MYC-IgH* необходимо использовать ПЦР длинных фрагментов (ПЦР-ДФ), которая позволяет амплифицировать большие участки ДНК [12, 18–20].

Цель исследования: выявить перестройки *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ при диагностике лимфомы/лейкоза Беркитта, сравнить результаты ПЦР-ДФ с цитогенетическими методами, а также оценить возможности использования ПЦР-ДФ для анализа МДБ и МОБ.

Пациенты и методы

Пациенты. В исследование были включены 55 пациентов с диагнозом лимфома/лейкоз Беркитта в возрасте от 2 до 23 лет (медиана 7 лет), находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии Минздрава Республики Беларусь (Минск) в период 2001–2015 гг. Диагноз лимфомы/лейкоза Беркитта устанавливали в соответствии с морфологическими и иммунологическими критериями классификации ВОЗ [21]. Стадирование проводили по классификации S.Murphy [22]. Пациенты получали лечение по протоколам NHL-BFM-95 и В-НХЛ-2004/2010М [5, 23]. Время наблюдения за последним пациентом, включенным в исследование, составило 7 мес.

Определение перестройки *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ. До начала лечения перестройку *c-MYC-IgH* определяли с помощью ПЦР-ДФ в 107 биологических образцах: ткань опухоли (29 образцов), асцитическая и плевральная жидкости (9 и 5 образцов соответственно), костный мозг – КМ (46 образцов), периферическая кровь – ПК (18 образцов). На этапах лечения МОБ исследовали в 67 образцах КМ и/или 52 образцах ПК. Для отработки и оптимизации ПЦР-ДФ использовали клеточную линию Raji с транслокацией $t(8;14)(q24;q32)$.

Выделение ДНК. Ткань лимфатического узла измельчали и отмывали в натрий-фосфатном буфере PBS (phosphate-

Таблица 1. Праймеры для ПЦР-ДФ химерного гена *c-мус-IgH*

| Название праймера | Последовательность | Ссылка |
|-------------------|--|--------|
| <i>c-мус/M9</i> | 5' – GAGATCCTCTGGGGTTTGGGAGATAACCCATGG – 3' | [12] |
| <i>c-мус/M6</i> | 5' – ACAGTCCTGGATGATGATGTTTTGATGAAGGTCT – 3' | [19] |
| <i>c-мус/M5</i> | 5' – AGCGGGAGGCAGTCTTGAGTTAAAGGGGTC – 3' | [12] |
| <i>c-мус/M5.4</i> | 5' – AAGCCAAATGCCAATCTTAAAGGATCAGGG – 3' | |
| <i>c-мус/M3</i> | 5' – TACTACAGCGAGTTAGATAAGCCCGAAAACC – 3' | |
| <i>c-мус/M1</i> | 5' – GCTATCTGGATTGGATACCTTCCACCCAGACTG – 3' | [12] |
| <i>c-мус/M0</i> | 5' – CCCAGCCCCACACATGATTTGTTGCTCCCTG – 3' | [12] |
| <i>c-мус up</i> | 5' – AGCTTGTGGCCGTTTGGGTTTGGTGG – 3' | [12] |
| <i>Cμ/03</i> | 5' – TGCTGCTGATGTCAGAGTTGTTCTTGTATTCCAG – 3' | [19] |
| <i>Cγ/02</i> | 5' – AGGGCAGCGTACCACGCTGCTGAGGGAGTAGAGT – 3' | [19] |
| <i>Cα/01</i> | 5' – TCGTGTAGTCTTACGTTGGCATGTCACGGACTTG – 3' | [19] |
| JH | 5' – ACCTGAGGAGACGGTGACCAAGGT – 3' | [20] |

buffered saline, “Sigma-Aldrich”, США). Клетки асцитической, плевральной жидкости, а также клетки линии Raji отмывали в PBS. Мононуклеарные клетки выделяли из ПК и КМ на градиенте плотности Histopaque (“Sigma-Aldrich”, США). Материал сохраняли при температуре –80°C. ДНК выделяли с помощью набора DNAzol® Reagent (“Invitrogen”, США). Количество и качество ДНК измеряли спектрофотометрически при длине волны 260 и 280 нм (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, США).

ПЦР-ДФ для определения *c-MYC-IgH*. Для определения перестройки *c-MYC-IgH* праймер *c-мус/M6* ко 2-му экзону гена *c-MYC* комбинируют с одним из 4 праймеров к локусу *IgH* (*Cμ/03*, *Cγ/02*, *Cα/01*, *JH*), как было описано ранее [12, 20] (табл. 1).

Праймер *Cμ/03* отжигается («садится на последовательность гена») в константном регионе *IgM*; праймер *Cγ/02* – в регионах *IgG1*, *IgG2* и *IgG4*, праймер *Cα/01* – в регионах *IgA1* и *IgA2*. Праймер *JH* отжигается на 3' конце соединительного J (joining) сегмента, консервативном участке между сегментами гена иммуноглобулина *IgHJ1*, *IgHJ2*, *IgHJ5* и *IgHJ6*. Праймеры для обоих генов подбирали к антисмысловым цепям в обратной ориентации, так как при перестройке *c-MYC-IgH* гены ориентированы «голова к голове» (рис. 1).

Качество геномной ДНК и пригодность образца для анализа определяли с помощью праймеров *c-мус/M6* и *c-мус/M9* в комбинации с праймером *c-мус up* к нормальному гену *c-MYC*, позволяющей амплифицировать продукты большого размера – 4,9 тысячи пар нуклеотидов (т.п.н.) и 8,2 т.п.н. соответственно.

Для проведения ПЦР использовали набор QIAGEN LongRange PCR Kit (США). Реакцию ПЦР проводили в объеме 25 мкл, состав реакционной смеси: 2,5 мкл Long Range PCR Buffer (10×), 500 μM dNTP, по 0,4 μM каждого праймера,

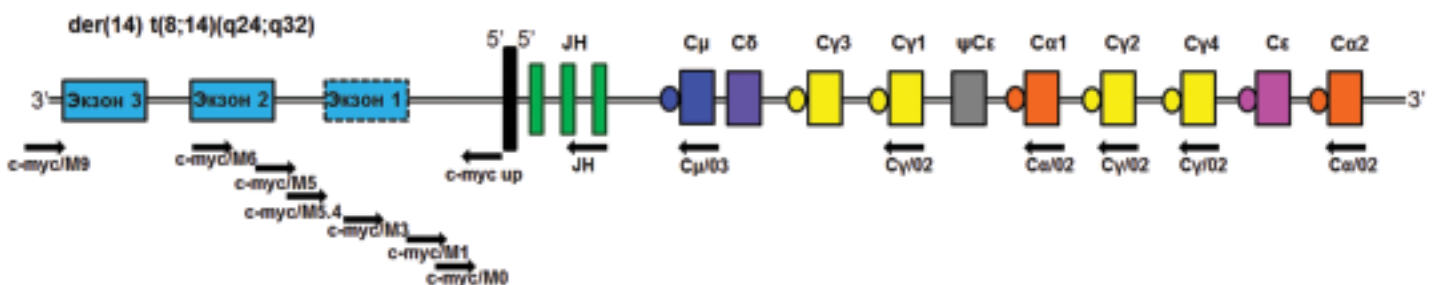


Рис. 1. Расположение праймеров для определения *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ. Пример перестройки, вовлекающей JH-участок цепи *IgH* и 5'-участок гена *c-MYC*. Расположение праймеров показано стрелками.

1,3U Long Range PCR Enzyme Mix и 150–250 нг образца ДНК. ПЦР проводили на термоциклере Biometra T3000 (Германия), условия проведения амплификации следующие: денатурация при температуре 94°C в течение 3 мин, 10 циклов (денатурация при температуре 94°C в течение 30 с, отжиг при температуре 68°C в течение 30 с, элонгация при температуре 68°C в течение 8 мин), затем 23 идентичных цикла с постепенным увеличением времени элонгации (на 20 с в каждом последующем цикле) и финальная элонгация при температуре 68°C в течение 10 мин. После проведения амплификации продукты разделяли в агарозном геле (1% агарозы в TBE (Tris/boric acid/EDTA) буфере, окрашенном этидиум бромидом) и визуализировали в ультрафиолетовом илюминаторе.

Для уменьшения продуктов амплификации и повышения чувствительности при определении МДБ проводили дополнительные 5 реакций ПЦР-ДФ с праймерами к *c-MYC*, расположенными выше *c-мус/M6* (табл. 1). Эти 6 праймеров (*c-мус/M5*, *c-мус/M5.4*, *c-мус/M3*, *c-мус/M2*, *c-мус/M1*, *c-мус/M0*) комбинируют с одним из праймеров к локусу *IgH*, определенному в первом шаге (праймеры *Cμ/03*, *Cγ/02*, *Cα/01* или *JH*). На электрофорезе бенды располагаются «лесенкой». Для определения МДБ использовали комбинацию праймеров, амплифицирующих наименьший продукт (рис. 2).

Определение чувствительности ПЦР-ДФ. Для определения чувствительности делали ряд разведений диагностической ДНК пациента в ДНК донора (рис. 3).

G-окрашивание. Кариотипирование опухолевых клеток методом дифференциального G-окрашивания выполняли у 41 пациента. Клетки КМ, асцитической/плевральной жидкости и опухолевой ткани выделяли, культивировали и фиксировали по стандартным методикам [24]. Зафиксированную культуру клеток раскапывали на стекла и окрашивали с помощью Гимза-трипсин-G-дифференциальной окраски. Анализ и учет метафазных пластинок осуществляли в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой (International System for Cytogenetic Nomenclature – ISCN) соответствующего года для проводимых исследований. В статье приведены данные в соответствии с рекомендациями ISCN 2013 г. [25].

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization – FISH). Исследование перестроек гена *c-MYC* с помощью метода FISH проводили у 32 пациентов на метафазных пластинках и/или на интерфазных ядрах. Для интерфазной FISH (i-FISH) использовали фиксированный материал с сохраненными ядрами и ДНК – выделенные и зафиксиро-

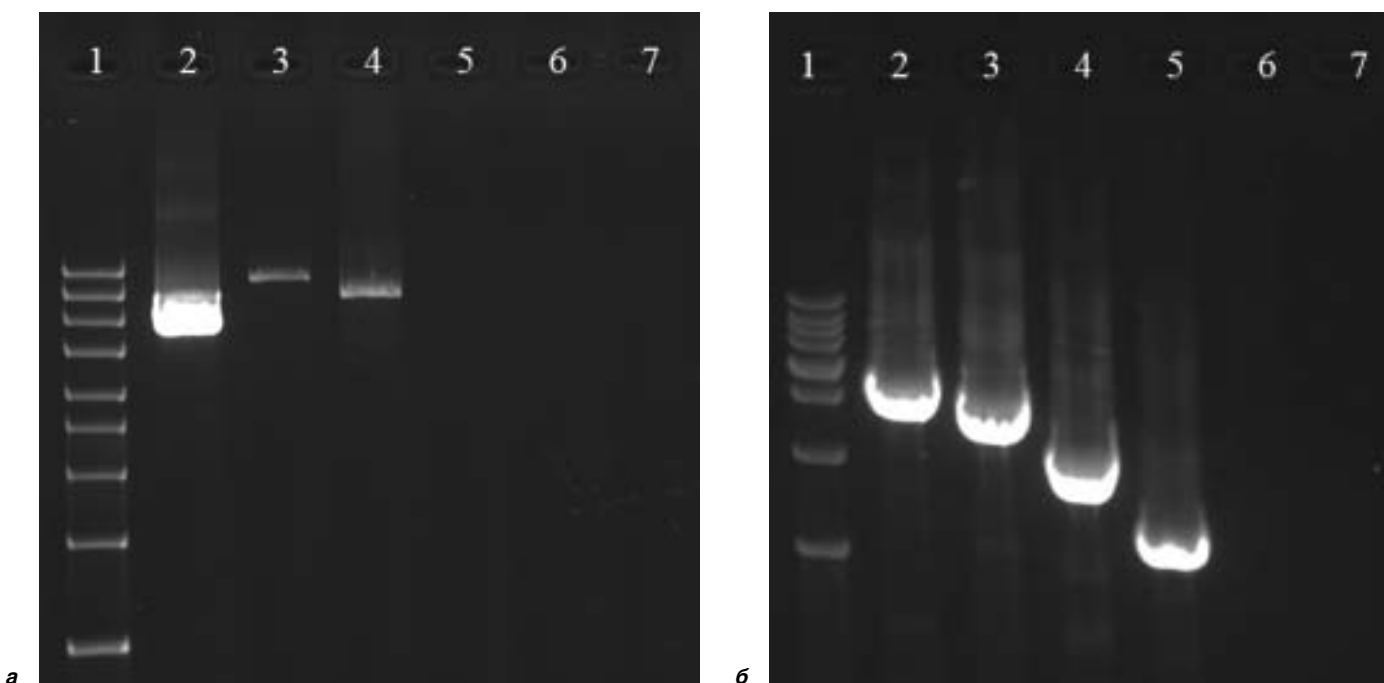


Рис. 2. Амплификация *c-MYC-IgH*: **а** – 1-й шаг амплификации *c-MYC-IgH*: 1 – маркер молекулярного веса; 2 и 3 – контроли качества ДНК (*c-тус/M6* и *c-тус/M9* соответственно в комбинации с праймером *c-тус up*); 4 – химерный ген *c-MYC-IgH* (праймеры *c-тус/M6* и *Cγ/02*); **б** – 2-й шаг амплификации *c-MYC-IgH*: 1 – маркер молекулярного веса; 2–5 – продукты амплификации *c-MYC-IgH* (2 – *c-тус/M6* и *Cγ/02*; 3 – *c-тус/M5* и *Cγ/02*; 4 – *c-тус/M5.4* и *Cγ/02*; 5 – *c-тус/M3* и *Cγ/02*) располагаются «лесенкой».

ванные клетки опухоли, асцитической/плевральной жидкости, КМ, мазки, срезы с формалин-фиксированных тканей, заключенных в парафиновые блоки. Окраску методом FISH осуществляли по стандартному протоколу фирмы-производителя. В исследовании использовали зонды на разрыв *MYC Break Apart* фирм “ДАКО” (Дания) и “Abbott Molecular” (США). В нормальной клетке 5'- и 3'-регионы гена *c-MYC*, окрашенные разными цветами, располагались рядом, образуя два слитных сигнала. При наличии в материале реаранжировки гена *c-MYC* наблюдались изолированные 5'-, 3'-сигналы и один слитный сигнал нормальной копии гена *c-MYC*.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Показатели общей (overall survival – OS, событие – смерть пациента) и свободной от прогрессии (progression-free survival – PFS, события – прогрессия, рецидив) выживаемости рассчитывали по методу Каплана–Майера. Результаты сравнивали с помощью log-rank теста. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Среди обследованных 55 пациентов у 3 (5,5%) пациентов была I стадия лимфомы Беркитта, у 6 (10,9%) – II стадия лимфомы Беркитта, у 18 (32,7%) пациентов – III стадия лимфомы Беркитта, у 10 (18,2%) пациентов – IV стадия лимфомы Беркитта, у 18 (32,7%) пациентов – лейкоз Беркитта. Соотношение по полу (мужской : женский) составило 5,1 : 1. Полная ремиссия была достигнута у 51 (92,7%) пациента. Один пациент умер до начала лечения от кровоизлияния в головной мозг. От инфекционных осложнений умерли 3 пациента, из них на этапе индукции ремиссии 2 пациента и 1 пациент в полной ремиссии. Прогрессия в ходе лечения

была диагностирована у 2 пациентов, ранний рецидив – у 4 пациентов, все они умерли от опухолевой прогрессии или от инфекционных осложнений на фоне резистентности к химиотерапии. Медиана наблюдения за пациентами составила 42 мес (от 1-го дня до 14,2 года). PFS составила $82 \pm 5\%$.

Положения точек разрывов в гене *IgH*. Большинство случаев лимфомы/лейкоза Беркитта характеризуются *c-MYC* транслокацией (8q24) на тяжелую цепь Ig (14q32) или

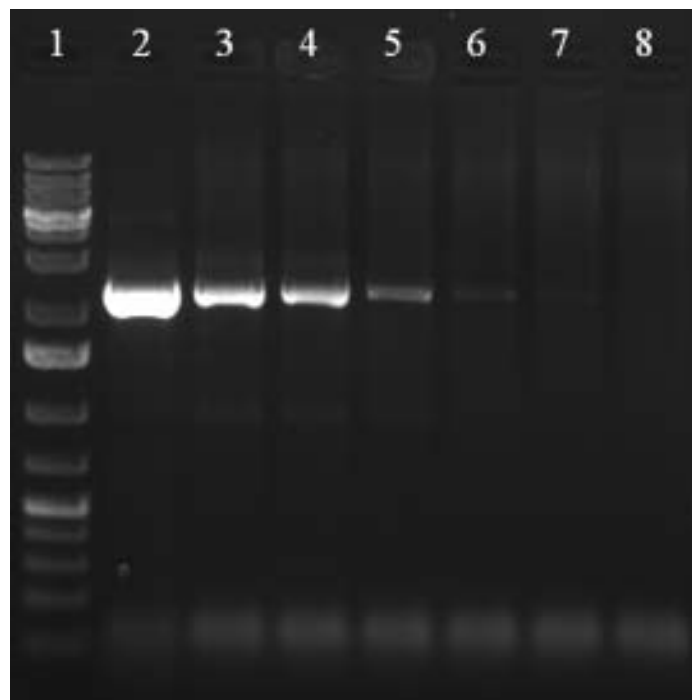


Рис. 3. Разведения ДНК пациента 10^0 – 10^{-6} : 1 – маркер молекулярного веса; 2–8 – разведения 10^0 – 10^{-6} .

Таблица 2. Сопоставление результатов определения перестройки гена *c-MYC* с помощью ПЦР-ДФ, метода FISH и стандартного цитогенетического анализа

| ПЦР-ДФ (<i>c-MYC-IgH</i>) (n = 55) | G-окрашивание [t(8;14)(q24;q32)] (n = 41) | FISH (перестройка <i>c-MYC</i> *) (n = 32) | Всего (n = 55) | Примечание |
|--|---|---|-------------------|--|
| + | + | + | 11 | Результат ПЦР-ДФ положительный, подтвержденный цитогенетически |
| + | + | Н.д. | 16 | |
| + | Н.д. | + | 4 | |
| + | – | + | 1 | |
| + | Н.д. | – | 2 | |
| + | Н.д. | Н.д. | 1 | Результат ПЦР-ДФ отрицательный, подтвержденный цитогенетически |
| – | Н.д. | – | 3 | |
| – | t(8;22)(q24;q11) | Н.д. | 1 | |
| – | + | + | 4 | |
| – | + | +* | 2 | |
| – | + | Н.д. | 5 | Нестандартная точка разрыва* |
| – | Н.д. | + | 3 | |
| – | Н.д. | +* | 1 | |
| – | – | + | 1 | Нестандартная точка разрыва* |
| Положительные тесты | | | | |
| 35 или 63,6% | 39 или 95,1% | 27 или 84,4% | 52 или 94,5% | |

*С помощью метода FISH выявляли только перестройку гена *c-MYC* без определения партнера, так как использовали зонд только «на разрыв» для *c-MYC*. «+» – тест положительный, «–» – тест отрицательный, н.д. – нет данных.

реже на λ (22q11) или κ (2p12) легкие цепи. Транслокации с вовлечением гена *c-MYC* также выявляются при диффузной В-крупноклеточной лимфоме, однако чаще в сочетании с другими перестройками, затрагивающими гены *BCL2* и *BCL6*, и являются предположительно вторичным событием [11, 21, 26–28]. При лимфоме с морфологическими и иммунофенотипическими чертами лимфомы Беркитта выявление изолированной транслокации гена *c-MYC* на тяжелую или легкую цепь Ig является определяющим критерием для постановки диагноза [1].

Точки разрывов в пределах тяжелой цепи Ig разбросаны на участке более чем 100 т.п.н., такая же ситуация наблюдается и для гена *c-MYC*, поэтому для выявления *c-MYC-IgH* необходимо проведение ПЦР-ДФ, позволяющей амплифицировать участки более 1–10 т.п.н. [12, 18–20].

При спорадической лимфоме/лейкозе Беркитта точка разрыва на 14-й хромосоме (чаще всего при перестройке *c-MYC-IgH*) находится в переключающих (switch) регионах IgH. В нашем исследовании точку разрыва определяли в зависимости от праймера, с которого проходила положительная амплификация *c-MYC-IgH*. У пациентов, у которых была выявлена перестройка *c-MYC-IgH* (n = 35), наиболее часто точка разрыва встречалась в интроне между JH и C μ (праймер C μ /O3) – у 20 (57,1%) пациентов. Реже встречались разрывы в интронах, предшествующих *IgG1*, *IgG2* и *IgG4* (праймер C γ /O2), – у 7 (20%) пациентов, в интронах, предшествующих *IgA1* и *IgA2* (праймер C α /O1), – у 5 (14,3%) пациентов, в интронах, предшествующих *IgH J1-J6* (праймер JH), – у 3 (8,6%) пациентов.

Сравнение результатов определения перестройки *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ, метода FISH и стандарт-

ного цитогенетического анализа. В нашей работе перестройка *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ была выявлена у 35 (63,6%) из 55 пациентов: у 13 (72,2%) из 18 пациентов с лейкозом Беркитта и у 22 (59,5%) из 37 с лимфомой Беркитта (табл. 2), что совпадает с данными других исследователей, которые диагностировали данную перестройку в 52–87% случаев [6, 8, 9, 12, 18, 20, 29].

Перестройка гена *c-MYC* была выявлена у 39 (95,1%) из 41 пациентов с помощью G-окрашивания и у 27 (84,4%) из 32 пациентов – методом FISH (табл. 2).

При сопоставлении результатов наличие перестройки *c-MYC-IgH*, выявленное с помощью ПЦР-ДФ, было подтверждено с помощью G-окрашивания [по наличию транслокации t(8;14)(q24;q32)] и/или с помощью метода FISH (по наличию перестройки гена *c-MYC*) в 32 (94,1%) из 34 случаев. Отсутствие перестройки *c-MYC-IgH* подтвердилось в 4 (26,7%) из 15 случаев: у 3 пациентов с помощью метода FISH и у одного пациента с помощью G-окрашивания была выявлена другая транслокация t(8;22)(q24;q11).

При этом *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ мы выявили только у 27 (71,1%) из 38 пациентов с цитогенетически подтвержденной транслокацией t(8;14)(q24;q32). Расхождение данных ПЦР-ДФ с результатами G-окрашивания наблюдалось у 11 пациентов с транслокацией t(8;14)(q24;q32), из них у 2 пациентов с помощью метода FISH были обнаружены нестандартные перестройки. Невозможность выявления перестройки *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ может быть связана с большой вариабельностью точек разрыва/слияния двух генов и большим размером потенциальных продуктов амплификации, наличием нестандартных точек разрыва или мутациями/делециями в участках генов *c-MYC* и IgH, на которые отжигаются праймеры. В некоторых случаях, особенно при эндемической форме лимфомы Беркитта, при транслокации t(8;14) разрывы случаются в области 300 т.п.н. выше гена *c-MYC* [30]. В нашем исследовании у 3 пациентов с помощью метода FISH были выявлены аберрации с нестандартными точками разрыва гена *c-MYC* (в 5' регуляторном регионе гена *c-MYC*, что детектировалось как дополнительный сигнал в ядре), которые не могут быть выявлены с помощью ПЦР-ДФ. Поэтому стандартный цитогенетический анализ и FISH остаются важными методами определения t(8;14)(q24;q32) и вариантных транслокаций t(2;8)(p11;q24), t(8;22)(q24;q11), а также необходимыми методами для диагностики вторичных хромосомных аберраций.

Приблизительно в 7–12% случаев перестройки гена *c-MYC* могут не выявляться с помощью метода FISH [11, 21, 27]. Однако это не исключает наличие транслокации с вовлечением гена *c-MYC*, которая потенциально может быть выявлена с помощью других методов [21]. В нашем исследовании перестройку *c-MYC-IgH* с помощью метода FISH не удалось выявить у 5 (15,6%) пациентов, при этом у двоих из них наличие транслокации *c-MYC-IgH* было диагностировано с помощью ПЦР-ДФ (G-окрашивание не проводили). Наличие перестройки было подтверждено секвенированием. Подобные результаты были получены T.Burmeister et al. [18], которые выявили *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ у одного пациента, у которого перестройка не выявлялась с помощью метода FISH и G-окрашивания. Возможно, это связано с микроинсерцией участков генов *c-MYC* или IgH, как это было

показано E.Haralambieva et al., которые выявили инсерцию гена *c-MYC* вместо транслокации [26].

Несмотря на то, что G-окрашивание дает наиболее полную картину всех генетических нарушений, возможно получение ложноотрицательных результатов, что мы наблюдали у 2 пациентов. У одного пациента результаты ПЦР-ДФ и метода FISH были положительными, а результат G-окрашивания – отрицательным (46, XY, dup(1)(q21q32), inc [4]/46, XY [2]), что могло быть связано с малым количеством проанализированных метафаз, их плохим качеством и неполным разбором. У другого пациента результаты ПЦР-ДФ и G-окрашивания (46, XY, del(19)(q13) [4]/ 46, XY[20]) были отрицательными, а результат метода FISH – положительным. У этого пациента было проанализировано достаточное количество метафаз хорошего качества, поэтому несоответствие данных G-окрашивания и метода FISH может объясняться отсутствием метафаз *c-MYC*-позитивного клона клеток (неправильно подобрано время фиксации, низкий митотический индекс данного клона клеток) или абберацией по типу микроинсерции (вне разрешающей способности световой микроскопии).

Таким образом, только комбинация методов позволила выявить перестройки гена *c-MYC* у 52 (94,5%) из 55 пациентов с лейкозом/лимфомой Беркитта.

При применении ПЦР-ДФ не было получено ложноположительных и неоднозначных результатов, что очень важно при использовании этого метода для диагностики лимфомы/лейкоза Беркитта.

При лейкозе Беркитта мы проверяли применимость ПЦР-ДФ для первичной диагностики в ПК. У 4 пациентов с лейкозом Беркитта и перестройкой *c-MYC-IgH*, выявленной с помощью ПЦР-ДФ в КМ, перестройка также была выявлена и в ПК.

Преимуществом ПЦР-ДФ по сравнению со стандартным цитогенетическим исследованием является более высокая чувствительность, для анализа не требуются жизнеспособные клетки, и ПЦР-ДФ может быть выполнена на образцах ПК, когда классический цитогенетический анализ невозможен из-за отсутствия метафаз или низкого количества бластных клеток. Этот метод позволяет у некоторых пациентов выявить перестройку *c-MYC-IgH*, которую не удалось выявить с помощью G-окрашивания и метода FISH, а также дает возможность точно определить партнера гена *c-MYC*, участвующего в перестройке. Кроме того, ПЦР-ДФ не дает ложноположительных результатов и является более дешевым, быстрым и доступным методом для большинства молекулярно-генетических лабораторий.

Недостатками ПЦР-ДФ являются высокие требования к качеству исследуемого материала (анализ невозможен на деградированной ДНК) и возможность выявления только перестройки *c-MYC-IgH* у 2/3 пациентов с лимфомой/лейкозом Беркитта.

Чувствительность метода. Чувствительность ПЦР-ДФ в нашем исследовании составила 10^{-2} – 10^{-5} и сильно варьировала среди пациентов, что могло быть связано с размером продуктов амплификации (1–12 т.п.н.) и, соответственно, эффективностью ПЦР, а также качеством ДНК (степенью деградированности). Аналогичные результаты были получены другими исследователями [6, 12, 18, 20].

МДБ. МДБ в КМ и/или ПК с помощью ПЦР-ДФ определяли у 17 пациентов с лейкозом/лимфомой Беркитта с подтвержденной перестройкой *c-MYC-IgH* в материале опухоли. У всех пациентов ($n = 3$) I–II стадией лимфомы Беркитта перестройку *c-MYC-IgH* не удалось выявить с помощью ПЦР-ДФ в КМ и ПК. Среди пациентов с III стадией лимфомы Беркитта только у 1 (11,1%) из 9 пациентов была выявлена перестройка *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ в КМ и ПК, причем перестройка *c-MYC-IgH* была выявлена в пунктате только одной из двух исследованных точек КМ. У всех пациентов с IV стадией лимфомы Беркитта с морфологическим поражением КМ ($n = 3$, бластные клетки 6,3, 12 и 17,8%) и без него ($n = 2$) перестройка *c-MYC-IgH* была выявлена в КМ и ПК. В дальнейшем рецидив развился у одного пациента с III стадией лимфомы Беркитта, который был МДБ-негативным (ПЦР-ДФ), и у одного пациента с IV стадией лимфомы Беркитта (с поражением центральной нервной системы), который был МДБ-позитивным.

Мы показали возможность диагностики *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ в ПК у пациентов с диссеминированными формами лимфомы Беркитта. Причем у всех пациентов, у которых мы выявили *c-MYC-IgH* в ПК ($n = 6$), перестройка также была обнаружена в КМ. Полученные данные отличались от результатов K.Busch и соавт. [12], которые обнаружили *c-MYC-IgH* в КМ только у 3 из 6 пациентов, у которых перестройка была выявлена в ПК.

ПЦР-ДФ может быть использована для выявления МДБ у пациентов с лимфомой Беркитта, а также для верификации результатов морфологического исследования КМ. В нашем исследовании, как и в исследованиях L.Mussolin и соавт. [8, 9], МДБ с помощью ПЦР-ДФ была выявлена у пациентов с продвинутыми стадиями лимфомы Беркитта (III/IV стадиями), в том числе без морфологических признаков поражения КМ. B.Shiramizu et al. также выявили МДБ по реаранжировкам Ig у детей и взрослых со зрелой НХЛ группы промежуточного риска (III–IV стадии) без видимого морфологического поражения КМ [31]. В нашем исследовании у всех пациентов с IV стадией лимфомы Беркитта с морфологическим поражением КМ и без него была выявлена перестройка *c-MYC-IgH* в КМ и ПК. Таким образом, ПЦР-ДФ обладает более высокой чувствительностью в отношении выявления МДБ, чем морфологический метод.

L.Mussolin et al. показали, что наличие МДБ имеет неблагоприятное прогностическое значение при лимфоме Беркитта [8, 9]. В нашем исследовании мы такой закономерности не обнаружили, что может быть связано с меньшим размером выборки или разными протоколами лечения. OS и PFS составили $82 \pm 12\%$ и $90 \pm 9\%$ для МДБ-негативных пациентов и $67 \pm 19\%$ и $80 \pm 18\%$ для МДБ-позитивных пациентов соответственно при медиане наблюдения 42 мес ($p > 0,05$).

МОБ определяли с помощью ПЦР-ДФ в КМ и/или ПК на этапах лечения у 15 пациентов с подтвержденной перестройкой *c-MYC-IgH*.

Среди пациентов с лейкозом Беркитта ($n = 7$) после про-фазы наличие МОБ было выявлено у 4 из 5 пациентов, после 1-го блока химиотерапии все 7 пациентов стали МОБ-отрицательными как в КМ, так и в ПК. Все они оставались МОБ-отрицательными при последующем монито-

ринге. У одного пациента развился рецидив, у него перестройка *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ вновь была выявлена только в рецидиве.

У пациентов с III–IV стадией лимфомы Беркитта ($n = 4$) с положительной МДБ, выявленной с помощью ПЦР-ДФ, после профазы наличие МОБ было выявлено только у одного пациента, после 1-го блока химиотерапии все четверо пациентов были МОБ-отрицательными, ни у кого из них не развился рецидив. У МДБ-отрицательных пациентов с III–IV стадией лимфомы Беркитта ($n = 4$) при дальнейшем контрольном обследовании на этапах лечения признаки МОБ не выявлены. Однако у одного пациента в дальнейшем развился рецидив абдоминальной опухоли (без морфологического поражения КМ и при отрицательном результате ПЦР-ДФ).

L. Mussolin et al. показали, что наличие МОБ, выявляемое с помощью ПЦР-ДФ у детей при лимфоме/лейкозе Беркитта после 1-го цикла химиотерапии, оказывает негативное влияние на развитие рецидива и показатели PFS [6, 8]. В нашем исследовании ПЦР-ДФ не была информативной для предсказания развития рецидива: все пациенты были МОБ-отрицательными, что подтверждалось с помощью ПЦР-ДФ уже после проведения профазы или 1-го блока химиотерапии, у части пациентов еще до достижения клинической ремиссии. У пациентов, у которых развился рецидив, никаких признаков наличия опухолевого клона до развития рецидива с помощью ПЦР-ДФ выявить не удалось. Это может быть связано с малым количеством рецидивов в нашем исследовании. В. Shiramizu et al. на небольшой выборке ($n = 10$) также не нашли взаимосвязи между наличием МОБ, выявляемой с помощью ПЦР в реальном времени по реаранжировкам В-клеточного рецептора, после индукции и консолидации ремиссии у детей и взрослых с лейкозом Беркитта [10]. ПЦР-ДФ обладает чувствительностью, недостаточной для определения МОБ, которая должна быть более 10^{-4} – 10^{-5} , кроме того, не позволяет количественно оценивать МОБ, что является принципиальным при мониторинге эффекта терапии и определения дальнейшей тактики лечения.

Таким образом, чувствительность ПЦР-ДФ недостаточна (позволяет определить МДБ только на очень ранних этапах лечения) и ее нецелесообразно использовать для мониторинга МОБ.

Заключение

ПЦР-ДФ позволяет выявить перестройку *c-MYC-IgH* у $\frac{2}{3}$ пациентов и может быть использована для первичной дифференциальной диагностики лимфомы/лейкоза Беркитта, а также для определения МДБ. При этом для оценки МОБ данный метод малоинформативен из-за невысокой чувствительности и получения только качественных результатов.

Проведение ПЦР-ДФ возможно у всех пациентов в отличие от G-окрашивания, однако *c-MYC-IgH* с помощью ПЦР-ДФ удается выявить только у части пациентов (в нашем исследовании у 71,1%) с цитогенетически подтвержденной транслокацией $t(8;14)(q24;q32)$. ПЦР-ДФ также позволяет выявить перестройку *c-MYC-IgH* у пациентов, у которых ее

не удалось выявить с помощью методов FISH и G-окрашивания. Таким образом, только комбинация методов позволяет выявить перестройки гена *c-MYC* у подавляющего большинства (в нашем исследовании у 94,5%) пациентов с лейкозом/лимфомой Беркитта и исключить получение ложноотрицательных результатов.

Литература/References

1. Mosse C, Weck K. The Molecular pathology of Burkitt lymphoma. In: Dunphy CH, ed. Molecular pathology of hematolymphoid diseases. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2010:227-85.
2. Mbulaiteye SM, Biggar RJ, Bhatia K, Linet MS, Devesa SS. Sporadic childhood Burkitt lymphoma incidence in the United States during 1992-2005. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53(3):366-70.
3. Pagano L, Caira M, Valentini CG, Fianchi L. Clinical aspects and therapy of sporadic Burkitt lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2009;1(2):e2009030.
4. Patte C, Auperin A, Gerrard M, Michon J, Pinkerton R, Sposto R, et al. Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood*. 2007;109(7):2773-80.
5. Woessmann W, Seidemann K, Mann G, Zimmermann M, Burkhardt B, Oschlies I, et al. The impact of the methotrexate administration schedule and dose in the treatment of children and adolescents with B-cell neoplasms: a report of the BFM Group Study NHL-BFM95. *Blood*. 2005;105(3):948-58.
6. Mussolin L, Pillon M, Conter V, Pigliione M, Lo Nigro L, Pierani P, et al. Prognostic role of minimal residual disease in mature B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Clin Oncol*. 2007;25(33):5254-61.
7. Jourdain A, Auperin A, Minard-Colin V, Aladjidi N, Zsiros J, Coze C, et al. Outcome of and prognostic factors for relapse in children and adolescents with mature B-cell lymphoma and leukemia treated in three consecutive prospective "Lymphomes Malins B" protocols. A Société Française des Cancers de l'Enfant study. *Haematologica*. 2015;100(6):810-7.
8. Mussolin L, Basso K, Pillon M, d'Amore ES, Lombardi A, Luzzatto L, et al. Prospective analysis of minimal bone marrow infiltration in pediatric Burkitt's lymphomas by long-distance polymerase chain reaction for $t(8;14)(q24;q32)$. *Leukemia*. 2003;17(3):585-9.
9. Mussolin L, Pillon M, d'Amore ES, Conter V, Pigliione M, Lo Nigro L, et al. Minimal disseminated disease in high-risk Burkitt's lymphoma identifies patients with different prognosis. *J Clin Oncol*. 2011;29(13):1779-84.
10. Shiramizu B, Goldman S, Smith L, Aagsalda-Garcia M, Galardy P, Perkins SL, et al. Impact of persistent minimal residual disease post-consolidation therapy in children and adolescents with advanced Burkitt leukaemia: a Children's Oncology Group Pilot Study Report. *Br J Haematol*. 2015;170(3):367-71.
11. Poiriel HA, Cairo MS, Heerema NA, Swansbury J, Aupérin A, Launay E, et al. Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Leukemia*. 2009;23(2):323-31.
12. Busch K, Borkhardt A, Wössmann W, Reiter A, Harbott J. Combined polymerase chain reaction methods to detect *c-myc/IgH* rearrangement in childhood Burkitt's lymphoma for minimal residual disease analysis. *Haematologica*. 2004;89(7):818-25.
13. Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L, et al. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001;194-220.
14. Neri A, Barriga F, Knowles DM, Magrath IT, Dalla-Favera R. Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85(8):2748-52.

15. Emanuel BS, Selden JR, Chaganti RS, Jhanwar S, Nowell PC, Croce CM. The 2p breakpoint of a 2;8 translocation in Burkitt lymphoma interrupts the V kappa locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81(8):2444-6.
16. Hollis GF, Mitchell KF, Battey J, Potter H, Taub R, Lenoir GM, et al. A variant translocation places the lambda immunoglobulin genes 3' to the c-myc oncogene in Burkitt's lymphoma. *Nature*. 1984;307(5953):752-5.
17. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*. 1999;19(1):1-11.
18. Burmeister T, Schwartz S, Horst HA, Rieder H, Gökbuget N, Hoelzer D, et al. Molecular heterogeneity of sporadic adult Burkitt-type leukemia/lymphoma as revealed by PCR and cytogenetics: correlation with morphology, immunology and clinical features. *Leukemia*. 2005;19(8):1391-8.
19. Akasaka T, Muramatsu M, Ohno H, Miura I, Tatsumi E, Fukuhara S, et al. Application of long-distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms. *Blood*. 1996;88(3):985-94.
20. Basso K, Frascella E, Zanesco L, Rosolen A. Improved long-distance polymerase chain reaction for the detection of t(8;14)(q24;q32) in Burkitt's lymphomas. *Am J Pathol*. 1999;155(5):1479-85.
21. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al, eds. Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO Lyon, France, IARC Press, 2008.
22. Murphy SB. Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults. *Semin Oncol*. 1980;7(3):332-9.
23. Самочатова ЕВ, Шелихова ЛН, Мякова НВ, Литвинов ДВ, Белогурова МБ, Фечина ЛГ и др. Возможности и проблемы современной терапии неходжкинских лимфом у детей и подростков. *Педиатрия. Журнал им. ГН Сперанского*. 2011;90(4):37-43.
24. Stasevich I, Utskevich R, Kustanovich A, Litvinko N, Savitskaya T, Chernyavskaya S, et al. Translocation (10;11)(p12;q23) in childhood acute myeloid leukemia: incidence and complex mechanism. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;169(2):114-20.
25. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, eds. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, 2013.
26. Haralambieva E, Boerma EJ, van Imhoff GW, Rosati S, Schuurings E, Müller-Hermelink HK, et al. Clinical, immunophenotypic, and genetic analysis of adult lymphomas with morphologic features of Burkitt Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(8):1086-94.
27. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2419-30.
28. Ferry JA. Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis. *Oncologist*. 2006;11(4):375-83.
29. zur Stadt U, Hoser G, Reiter A, Welte K, Sykora KW. Application of long PCR to detect t(8;14)(q24;q32) translocations in childhood Burkitt's lymphoma and B-ALL. *Ann Oncol*. 1997;8(Suppl. 1):31-5.
30. Joos S, Haluska FG, Falk MH, Henglein B, Hameister H, Croce CM, et al. Mapping chromosomal breakpoints of Burkitt's t(8;14) translocations far upstream of c-myc. *Cancer Res*. 1992;52(23):6547-52.
31. Shiramizu B, Goldman S, Kusao I, Agsaldá M, Lynch J, Smith L, et al. Minimal disease assessment in the treatment of children and adolescents with intermediate-risk (stage III/IV) B-cell non-Hodgkin lymphoma: a Children's Oncology Group report. *Br J Haematol*. 2001;153(6):758-63.

Информация о соавторах:

Волочник Елена Викторовна, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Минздрава Республики Беларусь
Адрес: 223053, Республика Беларусь, Минская область, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
Телефон: (375-17) 265-4222
E-mail: valochnikalena@gmail.com

Фёдорова Алина Степановна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела клинических исследований научного отдела Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Минздрава Республики Беларусь
Адрес: 223053, Республика Беларусь, Минская область, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
Телефон: (375-17) 265-4098
E-mail: alina_fedorova@list.ru

Алейникова Ольга Витальевна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Республики Беларусь, директор Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Минздрава Республики Беларусь
Адрес: 223053, Республика Беларусь, Минская область, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
Телефон: (375-17) 265-4049
E-mail: aleinikova2004@mail.ru

Information about coauthors:

Elena V. Volochnik, Molecular Genetic Laboratory, Scientific Department, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology
Address: 43, Frunzenskaya street, Brovlyany village, Minsk Region, 223053, Republic of Belarus
Phone: (375-17) 265-4222
E-mail: valochnikalena@gmail.com

Alina S. Fedorova, MD, PhD, Clinical Research Department, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology
Address: 43, Frunzenskaya street, Brovlyany village, Minsk Region, 223053, Republic of Belarus
Phone: (375-17) 265-4098
E-mail: alina_fedorova@list.ru

Olga V. Aleinikova, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Director of Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology
Address: 43, Frunzenskaya street, Brovlyany village, Minsk Region, 223053, Republic Belarus
Phone: (375-17) 265-4049
E-mail: aleinikova2004@mail.ru