

# APXИВ ΠΑΤΟΛΟΓИИ ARKHIV PATOLOGII

Реакция флюоресцентной in situ гибридизации (FISH-реакция) в диагностике онкологических заболеваний



# Автор:

**Карселадзе Аполлон Иродионович** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом патологической анатомии опухолей человека РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

# Рецензент:

**Волощук Ирина Николаевна** — доктор медицинских наук, профессор

- \

 $\Pi$  редназначение: для врачей-патологоанатомов, онкологов.

Отпечатано в полном соответствии с качеством предоставленных диапозитивов в ООО «ПОДОЛЬСКАЯ ПЕРИОДИКА» 142110, г. Подольск, ул. Кирова д. 15

# ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение. Общая характеристика методики FISH-ре- акции	2
II. Применение FISH-реакции при диагностике некоторых опухолевых заболеваний человека	\2
1. Системные поражения кроветворных органов и лимфомы:  Хронический миелолейкоз	12 12
Хронический лимфолейкоз Фолликулярная лимфома Лимфома зоны мантии Лимфома Беркитта Лимфома маргинальной зоны	.14
2. Применение FISH-реакции при солидных опухолях чело века:	<b>9-</b> 19
Нег2/пеи. N-myc. Определение транслокаций при саркомах мягких тканей. Диагностика рака мочевого пузыря. FISH и герминогенные опухоли.	20 21 24 25 27
III. Заключение	.30
IV. Протоколы основных типов FISH-реакции в диагностической патологии	.31

# I. ВВЕДЕНИЕ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДИКИ FISH-РЕАКЦИИ

Попытки локализовать и визуализировать участки генов на хромосоме под микроскопом предпринимаются с конца 60-х годов прошлого столетия. Первоначально для этой цели использовали нуклеотидные пробы, меченные радиоактивными изотопами, однако подобный методический подход был сопряжен с многими неудобствами, прежде всего с необходимостью соблюдать меры безопасности, и к тому же они были громоздкими. К середине 80-х годов была разработана методика мечения проб с помощью флюоресцентных красителей, с тех пор метод флюоресцентной in situ гибридизации (FISH) прочно вошел в арсенал методик целого ряда медико-биологических начк и, конечно, в диагностическую патологическую анатомию.

Как видно из названия, метод основывается на трех принципиальных положениях. Для проведения реакции должно произойти связывание (гибридизация) флюоресцирующей специфической пробы в условиях фиксированного (in situ) субстрата. Более общее формальное название метода обычно излагается следующим образом: FISH (Fluorescent in situ hybridization) — это цитогенетическая техника, которая используется для детекции локализации присутствия или отсутствия специфических ДНК-последовательностей на хромосомах. Для этого метода используются флюоресцентные пробы, связывающиеся только с теми участками хромосом, с которыми у них имеется высокой степени общность последовательностей. Установление факта наличия или отсутствия связывания пробы с хромосомным участком происходит в флюоресцентном микроскопе. Крайне упрощенно принцип FISH-реакции может быть изображен в виде следующей схемы. Фабричным или лабораторным методом готовится проба, содержащая нужную последовательность нуклеотидов, и метится флюоресцентными красителями. Исследуемый материал, содержащий ДНК, подвергается обработке для частичного разрушения ее молекулы с целью разрыва двухцепочечной структуры и тем самым облегчения доступа к искомому участку гена. Пробу и исследуемый материал выдерживают при определенной температуре (обычно 37°C) несколько часов (ночь). За этот период проба должна связаться с ДНК — гибридизоваться. После этого излишек пробы отмывают и препарат изучают в флюоресцентном микроскопе, снабженном набором фильтров, сконструированных с учетом волн возбуждения и поглощения, характерных для тех флюоресцентных красителей, которые имеются в пробах (см. рис. 1, 2, на вклейке). При кажущейся простоте эта методика чрезвычайно сложна и требует очень детальной отработки всех компонентов и стадий подготовки материала.

Начнем с проб. Как уже было сказано, основу проб составляют определенные нуклеотидные последовательности, которые имеют разную длину — от небольшого размера до целой хромосомы (см. рис. 3, на вклейке). Размер проб существенно влияет на эффективность гибридизации. Пробы, которые состоят из 300—500 пар оснований, с трудом проникают к мишени или формируют большие агрегаты, что приводит к сильной фоновой окраске. Короткими считаются олигонуклеотиды, состоящие из 20—100 пар оснований. Пробы могут быть разными и по способу их приготовления: клонированные, ферментативно амплифицированные и химически синтезированные. Не вдаваясь в подробности технологии продукции проб (они детально описаны в соответствующих руководствах, см. указатель литературы), мы можем посоветовать на начальном этапе пользоваться коммерческими пробами и постепенно внедрять в лабораторию методы синтеза проб (home brew). В каждой пробе нуклеотидные последовательности связаны с флюоресцентными красителями, обычно опосредованно, через антитела, поскольку непосредственно присоединенные красители, как это ни странно на первый взгляд, часто дают флюоресценцию плохого качества. В качестве флюоресцентных красителей используются флюоресцеина изотиоцианат (FITC), родамин, техасский красный и др.

Огромную роль в правильной оценке FISH-реакции играют фильтры. Каждый фильтр предназначен для получения флюоресценции определенного цвета. Для правильного подбора фильтров следует сравнить спектры возбуждения и поглощения флюоресценции для красителя и для фильтра. Они должны совпадать, причем очень важно помнить, что порой по многим (в том числе коммерческим) причинам эти параметры различаются для красителей разных фирм, поэтому в лаборатории обычно имеется набор фильтров, которые надо менять в течение дня в зависимости от фирмы — производителя пробы. Очень удобными являются комбинированные фильтры, например трехцветные, однако следует помнить, что если нужно анализировать изображение в метасистеме (на дисплее компьютера), то при использовании трехцветного фильтра переносить изображение на экран не всегда представляется возможным.

Пробы классифицируются и по месту их присоединения к молекуле ДНК. Как известно, каждая хромосома состоит из молекулы ДНК, оплетенной белками и разделенной центромерой на два плеча: короткое и длинное (см. рис. 4, на вклейке). Каждое плечо хромосомы разделено на районы, а районы — на

полосы. Отсчет их ведется от центромеры к теломере. Короткое плечо обозначается первой буквой французского слова реtite (маленький) — р, а длинное — буквой q (выбранной как пара к букве р и не имеющей смысловой нагрузки). Таким образом, запись 9а34 следует читать как полоса 4 в районе 3 на длинном плече хромосомы 9. По указанному принципу пробы делятся на центромерные, теломерные, для индивидуальных генов, для всей хромосомы (whole chromosome painting — WCP) (см. рис. 5. на вклейке). Пробы для определенных локусов вне центромерных участков еще называются локусспецифическими (LSI) в отличие от самих центромерных проб (СЕР) (см. рис. 6, 7, на вклейке). Следует помнить, что в аннотациях к пробам фирмы четко указано и нарисовано место на хромосоме, к которому гибридизируется проба. Желательно тщательно изучить этот участок на карте хромосомы (хромосомные карты в настоящее время легко получить на многих сайтах в Интернете). Это дает возможность оценить весь набор генов, находящихся и на всей хромосоме, и вокруг изучаемого участка, а иногда использовать пробу, которая изначально предназначена для изучения другого, но находящегося рядом гена.

Материалом для FISH-реакции в клинической практике служат парафиновые срезы тканей, мазки и отпечатки, в том числе мазки из осадков центрифугатов всевозможных жидкостей — мочи, аспита, спинномозговой, амниотической жилкости, спермы и др. FISH-реакция используется и для изучения структуры РНК, а также для гетерологичного чужеродного материала для человека — ЛНК- и РНК-вирусов (Эпстейна— Барр, папилломатоза человека и др.). Для проведения качественной реакции необходимо иметь четкие сведения о фиксации материала. Частицы тканей, фиксированных формалином, вполне пригодны для FISH-реакции, но следует помнить, что длительная формалиновая фиксация отрицательно влияет на результаты реакции. Однако и при использовании длительно фиксированных тканей тоже можно получить убедительные результаты. Важно иметь информацию о продолжительности предшествующей фиксации. Зная срок фиксации ткани в формалине, можно соответствующим образом изменить режим демаскировки. Другие фиксаторы для гистологического материала менее пригодны для реакции и используются в патологоанатомической практике гораздо реже. Декальцинация, если она была длительной, необратимо повреждает структуру хроматина и ДНК, но после кратковременной (в течение нескольких часов) декальцинации вполне можно добиться четкой локализации сигнала.

Как уже было сказано выше, материал перед гибридизацией следует обработать таким образом, чтобы двухцепочечная молекула ДНК диссоциировалась на раздельные цепи (см. рис. 8,

на вклейке). Этот этап реакции называется денатурацией. Денатурация может быть проведена как физическими (воздействие высоких температур) способами, так и с применением химических вешеств, иногла их сочетанием. Однако при этом нельзя допустить полного или значительного распада структуры ДНК. В этом и заключается одна из методических сложностей FISH-реакции, так как исследователь все время должен лавировать между двумя почти взаимоисключающими процессами: необходимостью разрыва цепей ДНК и сохранения при этом ее структуры. Для предотвращения сильного разрушения ДНК методика реакции включает применение веществ, ослабляющих связи между двумя цепями ЛНК и тем самым исключающих необходимость воздействия на материал высокой температуры. К числу таких веществ относится формамид (не путать с формалином). Формамид — это метанамид, амид муравьиной кислоты (НСОNН<sub>2</sub>). Может возникнуть вопрос: зачем надо денатурировать одноцепочечные пробы? Потому, что денатурация повышает чувствительность, убирая вторичные структуры даже в одноцепочечной структуре.

Белки, содержащиеся в клетке, мещают доступу пробы к нуклеотидным последовательностям. Для демаскировки необходимо удалить белки. С этой целью используется ферментативная обработка — обычно пепсином или протеазой. Примерный режим обработки ферментами прописан в методиках для основных типов реакций, однако окончательно он устанавливается эмпирически, индивидуально в каждой лаборатории. Время воздействия фермента на ткани и клетки зависит от многих факторов, в том числе и от влажности в лабораторных помешениях. Рекоменлуется иметь гигрометр и следить за тем. чтобы воздух не становился излишне сухим (оптимальная влажность 55%). На всех этапах реакции следует избегать высушивания материала. Необходимо помнить, что все работы по реакции должны вестись в затемненном помещении, а основные — просто в темноте, поскольку ДНК денатурируется под воздействием ультрафиолетового облучения. Следить за качеством переваривания материала помогает использование фазово-контрастного микроскопа. При отсутствии такового можно изучать предметные стекла при максимально опущенном конденсоре. Хорошо переваренный материал представлен только ядрами. Наличие цитоплазмы — фактор отрицательный, поскольку ее компоненты мешают последующей гибридизации. В таком случае стекла опять переносят в раствор фермента. Еще один очень важный признак недопереваривания клеток наличие зеленой аутофлюоресценции. Другая крайность чрезмерная длительность ферментативной обработки — приведет к необратимому разрушению структуры ДНК. В таком случае под микроскопом клеточные границы исчезают. Трудно

понять, где кончается одна клетка и начинается другая, или видны только тени от клеток. Для улучшения доступа пробы к мишени могут использоваться солевые растворы низкой концентрации, особенно при изучении небольших размеров клеток. Выдерживание материала, например в гипотоническом растворе КС1, приводит к набуханию клеток и отделению друг от друга нитей хроматина.

Ядра, которые предназначены для изучения методом FISH, должны лежать на стекле максимально изолированно. В участках нагромождения ядер сигналы накладываются друг на друга и их невозможно сосчитать. Это условие особенно трудно выполнить при исследовании парафиновых срезов. Кроме того, в гистологических препаратах ядра срезаны на разных уровнях, т. е. часть ДНК в них может отсутствовать. По этой причине на срезах гораздо более достоверны поиски признаков увеличения генетического материала. Учет же отсутствия (потерь) каких-либо участков гена на гистологических препаратах носит в определенной мере статистический характер и должен быть скорригирован с пониманием того, что определенная доля этих потерь механическая. Поэтому многие авторы считают, что диагностика делеций в гистологических препаратах при реакции FISH достоверна только при очень высокой частоте этого признака — в 50% клеток и более.

В отдельных случаях, когда искомые участки гена небольшие и есть опасность, что на гистологических срезах они с трудом будут выявляться, а нативного материала нет, можно использовать методику выделения ядер из парафиновых срезов. Хотя при этом ядра значительно повреждаются, все же большая часть генетического материала остается пригодной для FISH-реакции. Остальные методические детали подготовки материала для реакции будут указаны в типичных протоколах, приведенных в конце работы.

Гибридизацию материала нужно проводить несколько часов. Считается, что для связывания центромерных проб требуется меньше времени (3—5 ч), чем при локусспецифических пробах, однако на практике материал выдерживают ночь при температуре 37°С. Температурный режим следует соблюдать очень тщательно. При слишком высокой температуре не происходит связывания пробы и ДНК-мишени (отжига) и оба компонента — проба и ДНК-мишени — остаются одноцепочечными. При слишком низкой температуре, наоборот, отжиг происходит во многих неспецифических участках. Часто нужно эмпирически устанавливать режим гибридизации, помня о том, что для разрушения участков неспецифического связывания можно увеличить концентрацию формамида или уменьшить концентрацию солей и/или менять время гибридизации. Для автоматизации процесса фирмой "Abbott-Vysis" предложен

прибор HYBright, который позволяет проводить гибридизацию одновременно на 12 стеклах. Но если число проводимых реакций невелико, то обычно предпочитают класть материал в термостат. Для этого можно стекла положить в коробку из непрозрачного материала или обернуть ее темной бумагой. Главное. чтобы внутри коробки поддерживалась влажность, создаваемая смоченными в листиллированной воде марлевыми салфетками. С этой целью для сохранения влаги под покровным стеклом применяется следующий способ. Вокруг покровного стекла наносят клей (это может быть обычный резиновый клей), который высыхает и предотвращает испарение влаги с поверхности среза. По окончании гибридизации нужно тщательно удалить клей и снять покровное стекло. После того как на следующее утро препараты извлекли из термостата, следует этап отмывки. Это очень важный этап, поскольку плохо отмытый материал дает сильную фоновую окраску. Выделяют простую степень отмывки и так называемую строгую отмывку. В случае необходимости процедуру отмывки можно повторять.

На этом же этапе необходимо докрасить препараты раствором 4',6-диамино-2-фенилиндола (DAPI), который специфически связывается с ДНК и дает флюоресценцию голубого цвета. Интенсивность флюоресценции позволяет косвенно судить о степени удаления белков и тем самым о наличии доступа пробы к молекуле ДНК (см. рис. 9, на вклейке). Кроме того, эта окраска хорошо оттеняет сигналы других цветов. Препараты, окрашенные DAPI, очень удобно изучать предварительно под микроскопом, на этот раз уже флюоресцентном. Вид ядер при этом дает ценную информацию о том, сколько белка осталось в ядре. Навык оценки качества подготовки материала к дальнейшей обработке обычно вырабатывается эмпирически, после сравнения препаратов, обработанных при разных режимах.

Флюоресценция имеет свойство спонтанно уменьшаться и угасать, особенно после манипуляции с препаратом в флюоресцентном микроскопе. Для предотвращения этого нежелательного феномена срезы обрабатывают специальным раствором — так называемым антифейдом. Антифейд иногда добавлен фабрично в реагентную смесь, поэтому всегда надо сверяться с аннотацией к красителям.

Перед тем как перейти к учету результатов гибридизации в флюоресцентном микроскопе, необходимо очень тщательно изучить особенности микроскопической структуры изучаемых объектов в световом микроскопе. Это особенно важно для гистологических препаратов, поскольку в флюоресцентном микроскопе невозможно идентифицировать целый ряд морфологических параметров и иногда приходится ориентироваться вслепую. В флюоресцентном же микроскопе вначале объект следует рассмотреть при окраске DAPI. Это дает возможность не

только оценить качество проведенной реакции, но и определить подходящие для учета результатов реакции участки. В оптимально подготовленном материале клеточная цитоплазма отсутствует, а ядра имеют ровные края.

Учитывать результаты гибридизации следует в ядрах, лежащих изолированно, ни в коем случае не следует считать число сигналов в ядрах, лежащих друг на друге (можно ошибочно учесть сигнал, просвечивающий из другого ядра), в плохо очерченных ядрах (внеядерный сигнал!). Существуют числовые характеристики плотности распределения клеток по стеклу, принимаемые как эталонные значения, однако на практике ими редко пользуются.

На первых порах исследователю трудно ориентироваться в самих сигналах. Прежде всего следует помнить, что сигнал флюоресценции должен быть действительно флюоресцирующим. Не всякая окраска есть флюоресценция. Сигнал должен светиться. Во-вторых, на препарате неизбежно бывают участки фоновой окраски. Интенсивность истинного сигнала должна быть значительно выше фонолой. Реакцию следует считать успешной, если в 85% клеток обнаруживается 1 или более флюоресцирующих сигналов. Вследствие деконденсации хроматина сигнал может быть лишенным четкой геометрической формы, представленным в виде нескольких мелких нечетко связанных друг с другом неправильной формы точек — быть "расщепленным". Такие сигналы лучше не учитывать.

Следует обратить внимание на очень существенную деталь — регистрацию сигнала с использованием компьютерной системы. Дело в том, что для удобства чисто визуального восприятия сигнала по традиции оранжевый сигнал, видимый в микроскопе, регистрируется на дисплее компьютера в виде красного сигнала. Такая трансформация цвета позволяет увидеть слияние сигналов разного цвета (красный + зеленый) более четко, чем оранжевый + зеленый. Однако следует помнить, что на практике исследователь встречается и с другой, "истинно красной, флюоресценцией" — изначально красным сигналом. Об этой особенности надо всегда помнить при ознакомлении с иллюстративным материалом в книгах и статьях для правильной интерпретации результатов исследования. Среди разновидностей флюоресцентных сигналов есть сигнал, который кратко принято называть "аква" (от английского слова aqua) цвет морской волны.

Разберем общие положения интерпретации FISH-реакции.

FISH-реакция дает возможность регистрировать изменения в молекуле ДНК, происшедшие в результате увеличения числа копий гена — амплификации, потери гена — делеции, изменения числа хромосом, а также качественные изменения — перемещения локусов генов как в пределах одной и той же хромо-

сомы — инверсии, так и между двумя хромосомами — трансло-кации (см. рис. 10, на вклейке).

Амплификация, увеличение числа копий гена могут иметь двоякий механизм. В одних случаях лишние копии гена выстраиваются на этой же хромосоме (так называемые гомогенно окрашивающиеся участки) (см. рис. 11, на вклейке). В других случаях лишний генетический материал синтезируется эписомально, формируя двойные ацентрические хромосомы, как бы плавающие в кариоплазме в виде так называемых двойных штрихов (double minutes). Двойные ацентрические хромосомы имеют тенденцию к формированию агрегатов ампликонов, которые не поддаются точному количественному учету (см. рис. 12, на вклейке). Подсчитать число сигналов не всегда простое дело. Иногда один сигнал может иметь вид близко расположенных лискретных мелких точек, плохо контурироваться и т. д. Поэтому существует правило: сигналы считаются отдельными, если расстояние между ними больше их диаметра. Наиболее достоверным является превышение расстояния между двумя сигналами в два диаметра. Понятно, что при амплификации в виде двойных штрихов подобные критерии применить сложно.

Следует помнить еще об одном обстоятельстве. В клетке, которая прошла S-фазу, генетический материал удвоен, и в ней определяются два сигнала (чуть меньшего размера, чем перед S-фазой). Отличить такой сигнал от патологического порой очень сложно. Следует исходить из того, как представлены другие локусы в данной клетке. В упомянутых клетках другие локусы также будут удвоенными.

Выявление транслокации, т. е. перемещения участков гена, при FISH-реакции, основано на использовании красителей разных цветов. В местах транслокации выявляются сигнал, представленный примыкающими вплотную друг к другу двумя цветовыми пятнами, или (чаще) достоверное наложение двух цветов с формированием цвета флюоресцентного сигнала, отличного от исходных (так, слияние красного и зеленого цветов дает желтое свечение) (см. рис. 13, на вклейке). При этом следует помнить, что пробы могут быть основаны на разных принципах формирования транслокационного сигнала. Например, можно пометить ту часть гена, которая транслоцируется с одной хромосомы на другую, но можно пометить и точки разрыва на хромосоме, откуда переместился определенный локус. Поэтому всегда следует тщательно разобраться в структуре конструкции пробы, особенно когда сравниваются собственные результаты с данными литературы. Сигнал одного и того же цвета может иметь различный смысл в зависимости от конструкции пробы.

Частота ядер с положительным сигналом является очень

важным параметром. Для каждой конкретной пробы уже просчитана частота сигнала, имеющая лиагностическое значение. В пелом елиничные ялра с конфигурацией того или иного типа сигнала не следует принимать в расчет. Иногда происходит соматическое спаривание хромосом, иногла — механическое наложение. перекрытие разных участков хромосом с формированием артифициальной картины транслокации или других нарушений. Однако существует и другая точка зрения, которую не следует игнорировать, особенно при диагностике системных опухолевых заболеваний. Дело в том, что эти заболевания имеют локлиническую фазу, иногла дляшуюся годами. И у таких больных генетические нарушения могут быть зарегистрированы на ранней стадии патогенеза заболевания. Существуют единичные наблюдения, в том числе в нашей лаборатории, когда у больных, в костном мозге которых при FISH-реакции в 4% клеток была обнаружена транслокация t(9;22)(q34;qll), характерная для хронического миелоилного лейкоза, развернутая клиника этого заболевания проявилась спустя 3 года. Поэтому подобные находки, кажущиеся, на первый взгляд, диагностически незначимыми, должны послужить основанием для тшательного наблюдения за пациентами.

Тут же уместно рассмотреть форму записи транслокаций. Для этого надо вспомнить некоторые детали строения хромосомы и ее схематического изображения. Для обозначения транслокации вначале ставится буква t (translocation), в первых скобках указываются номера хромосом, между которыми происходит обмен генетического материала (9;22), а в следующих скобках приводятся названия локусов на соответствующих хромосомах (q34;q11). Запись вышеназванной транслокации нужно расшифровывать следующим образом: транслокация между соответствующими участками на длинном плече хромосомы 9 и длинном плече хромосомы 22.

В процессе подготовки материала и проведения FISH-реакции могут возникнуть артефакты, неудачи, сложные для интерпретации изображения. Попытаемся проанализировать наиболее частые осложнения и предложить способы их решения. Первая группа сложностей возникает из-за отсутствия или резкого ослабления сигнала. В таких случаях надо проверить микроскоп. Он может плохо функционировать, источник флюоресценции устарел, плохо центрирован, не соответствует системе фильтров. Все эти причины должны быть устранены совместно с мастером, который периодически следит за тем, чтобы линзы очищались, чтобы на них, а также на зеркалах не появлялись трещины, не было смещения источника флюоресценции.

Отсутствие или ослабление сигнала могут быть связаны с этапом денатурации и гибридизации. Чаще это неправильная температура в бане, где проходит денатурация. В отдельных

случаях следует продлить время гибридизации на несколько часов.

На интенсивность сигнала может влиять режим отмывки препарата. Обычно при этом использовался жесткий режим с неадекватной температурой. Иногда пузырьки воздуха могут остаться под покровным стеклом и препятствовать процессу гибридизации. Для их удаления можно смочить края покровного стекла гибридизационной смесью.

Бывают случаи, когда необходимо увеличить количество гибридизационной смеси.

Ферментативная обработка срезов могла быть слабой, поэтому необходимо удлинить период переваривания, к тому же следить за адекватностью рН раствора. В подобных случаях всегда нужно иметь представление о продолжительности изначальной фиксации материала, особенно присланного из другого учреждения. Ослабление сигнала может быть вызвано чрезмерно длительной фиксацией. В таких случаях один из способов исправить ситуацию — это опустить этап фиксации при предподготовке материала.

Сигнал слабеет и при потере ДНК. В таких случаях окраска DAPI будет очень слабой. Этот феномен чаще связан с изначально плохой фиксацией и обычно неустраним. Другая группа неудовлетворительных результатов — это неоднородность интенсивности сигнала по всему срезу. Подобную картину могут дать изначально неравномерное распределение пробы по стеклу, особенно при крупных размерах самого среза, и наличие пузырьков воздуха. Для выяснения причины следует оценить характер окраски ядер DAPI. Если слабая флюоресценция связана со слабой окраской DAPI, то надо увеличить время фиксации. Обратная ситуация — плохой сигнал при хорошей окраске DAPI — зависит от качества самого среза.

Наличие высокого фонового свечения на стекле свидетельствует о неудовлетворительной отмывке. Надо проследить, чтобы рН буфера для отмывки был в пределах 7.2-7.5, а температура бани составляла  $72+\Gamma C$ . Время отмывки следует увеличить до 5 мин, осторожно встряхивая при этом стекло. В подобных случаях хороший эффект дает увеличение температуры и концентрации формамида или снижение концентрации солей при промывке и гибридизации.

Причиной высокого фонового свечения иногда является наличие на стекле большого числа обрывков клеток.

Иногда к такому же результату приводит использование широкополосных фильтров, пропускающих много света. Выход — переключиться на узкополосные фильтры. При наличии диффузного характера сигнала следует сократить время денатурации или температуру на 2°C.

Иногда хромосомы нечетко контурированы. Это обычно

происходит при изначальном быстром высыхании материала, при обработке слишком свежего материала, когда, наоборот, срезы не высохли до денатурации. Следует отрегулировать время для высыхания, увеличить время старения мазков до 24 ч при комнатной температуре. Если срезы не высохли, можно подержать их 10—15 мин при температуре 45 °C до денатурации. Чрезмерно интенсивный сигнал, вызванный высокой концентрацией пробы, можно уменьшить, поместив нейтральной плотности фильтр по пути возбуждающей волны.

# II. ПРИМЕНЕНИЕ FISH-РЕАКЦИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ НЕКОТОРЫХ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

# 1. Системные поражения кроветворных органов и лимфомы *Хронический миелолейкоз (XMЛ)*

ХМЛ — это первое опухолевое злокачественное заболевание человека, связь которого с питогенетическим нарушением была убедительно и конкретно доказана. В 1960 г. ученые из США P. Nowell и D. Hungerford открыли у больных ХМЛ специфическую хромосому, названную по месту проводимых исследований филадельфийской хромосомой (Ph). В настоящее время четко установлено, что генез филадельфийской хромосомы связан с происходящей между хромосомами 9 и 22 транслокацией (9;22)(q34;q11) (см. рис. 14, на вклейке). На длинном плече хромосомы 9 имеется ген, названный геном ABL (от названия онкогена Abelson, открытого при мышином лейкозе). Соответственно на длинном плече хромосомы 22 имеется участок BCR (от английского breakpoint cluster region). При реципрокной транслокации указанных участков на хромосоме 22 формируется новый ген, кодирующий белок, обладающий тирозинкиназной активностью и определяющий злокачественность процесса. Идентификация этого слитного гена является одним из ругинных методов диагностики ХМЛ. Важное значение приобрел не только качественный, но и количественный учет ядер с транслокацией t(9:22)(q34:q11), поскольку динамика изменения числа таких ядер используется для оценки эффективности терапии, а также для раннего выявления рецидива болезни (молекулярный рецидив).

FISH-реакцию на ABL/BCR можно проводить на мазках крови, пунктатах костного мозга и даже (редко) на гистологических срезах. Поиски можно вести как в интерфазных ядрах, так и в метафазных пластинках. Обычно все же в лабораторию доставляют пунктаты костного мозга (о подготовке материала см. протокол).

Следует помнить, что для выявления участка транслокации

предложено несколько проб, основанных на разных принципах. Основная цель их конструирования — избежать ложноположительных результатов. Дело в том, что в 4% интерфазных ядер хромосомы 9 и 22 могут механически перекрывать друг друга и формировать сигналы, имитирующие транслокацию, поэтому при использовании ряда проб рекомендуется считать наличие положительных сигналов менее чем в 10% ялер нелостоверным. Однако при появлении более сложно сконструированных проб или применении двух проб разной конструкции (как, например, в нашей лабораторий) задача исключения ложноположительных результатов значительно облегчается. Правда, существует точка зрения, что даже минимальное число ядер с сигналами типа транслокации ABL/BCR должно быть учтено и оценено в контексте всей клинической картины болезни и послужить основанием для наблюдения за больными, поскольку, как уже было сказано выше, их наличие может быть очень ранней, доклинической манифестацией болезни.

Рассмотрим примеры реакции при ХМЛ с использованием двух проб фирмы "Abbott-Vysis". Одна проба LSI BCR/ABL с лвойным слиянием гибрилизируется к хромосоме 22al 1.2 (зеленая флюоресценция) и к хромосоме 9q34 (оранжевая флюоресценция) (см. рис. 15. на вклейке). В интерфазных ядрах нормальных клеток проба имеет вид четырех раздельных сигналов разного цвета. При наличии транслокации мы видим 2 раздельных сигнала (зеленый и оранжевый) и 2 слитных сигнала (желтый) (см. рис. 16, a, на вклейке). 1 желтый сигнал в этой пробе является результатом слияния 5'BCR- и 3'ABL-noследовательности, а другой — слияния З'ВСЯ- и 5'АВЬ-последовательности. В некоторых ядрах на производной (дериватной) хромосоме 9 можно увидеть неполное слияние, зияние между сигналами. Подобный феномен связан с особенностью конструкции самой пробы и приводит к тому, что часто формируется 1 слитный сигнал. Подобный сигнал может иметь диагностическое значение, если он встречается не менее чем в 20% ядер. Другая проба — так называемая LSI BCR/ABL двухцветная с одним слиянием — гибридизируется также к хромосомам 22q11.2 (зеленая флюоресценция) и 9q34 (оранжевая флюоресценция) (см. рис. 17, на вклейке). В интерфазных нормальных ядрах видны 4 раздельных сигнала каждого цвета. В ядрах с транслокацией с формированием филадельфийской хромосомы формируются 1 слитный сигнал (зеленый + оранжевый или желтый). 2 желтых и 1 зеленый сигнал (см. рис. 16.  $\delta$ . на вклейке).

В последние годы появились сообщения о том, что при XMЛ транслокации могут иметь комплексный характер с вовлечением третьей хромосомы, например t(5;9;22) и t(4;9;22). Предполагается, что при указанных вариантах происходит сту-

пенчатая транслокация с переносом классического слитного гена на другую хромосому.

#### Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ)

ХЛЛ — заболевание, являющееся результатом бесконтрольной пролиферации В-лимфоцитов, характеризуется целым набором цитогенетических и геномных нарушений, имеющих прогностическое значение и влияющих на тактику выбора метолов лечения. Деления части короткого плеча хромосомы 17 (17р), где локализуется ген р53 (см. рис. 18, а, на вклейке), встречается в 5–15% случаев ХЛЛ. У таких больных прогноз плохой, и они нужлаются в незамеллительном лечении. Лелеция длинного плеча хромосомы 11 (llq22-q23) (см. рис. 18, б. на вклейке), встречается у 10% больных ХЛЛ и также свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. У этих больных выраженное поражение лимфатических узлов. В результате этой делеции повреждается ген ATM (Ataxia teleangiectasia mutated). Трисомия хромосомы 12 встречается примерно в 1/4 случаев ХЛЛ. Делеция длинного плеча хромосомы 13 (13 gl4) — наиболее частая аномалия при ХЛЛ, она встречается не менее чем в половине случаев (см. рис. 18. в. на вклейке) и является благоприятным признаком. Иногда больные с этой аномалией живут годами без лечения.

Все названные геномные и хромосомные нарушения могут быть определены с помощью реакции как на интерфазных ядрах, так и на метафазных пластинках. Проведение исследования связано с определенными методическими сложностями. Во-первых, не всегда легко добиться роста клеток ХЛЛ в культуре тканей. Во-вторых, обязательно надо включать в исследование клетки нормального костного мозга в качестве внутреннего контроля. В отличие от ХМЛ, при котором все клетки являются носителями транслокации, при ХЛЛ порой трудно идентифицировать клетки лимфоидного ряда, что отрицательно сказывается на точности определения частоты того или иного признака. К тому же проба требует довольно много времени и подсчета очень большого числа клеток. Однако в условиях специализированного учреждения, где проведение пробы поставлено на поток, удается частично рационализировать методику подсчета и сократить время исследования.

Проба фирмы "Abbott-Vysis" для диагностики ХЛЛ состоит из двух наборов. В один набор входят пробы для идентификации локусов на хромосомах 17р и 11q (оранжевый и зеленый цвета соответственно) (см. рис. 19, а, на вклейке), а в другой — локусспецифичные пробы для хромосомы 12р11, для длинного плеча хромосомы 13 (13q14 и 13q34, оранжевый цвет и аква соответственно) (см. рис. 19, б, на вклейке). Следует помнить,

#### Фолликулярная лимфома (ФЛ)

ФЛ характеризуется медленным прогрессированием и переходом в лимфому более высокой степени злокачественности диффузную крупноклеточную лимфому (у 10-15% больных). Наиболее типичное цитогенетическое нарушение при ФЛ это транслокация (14:18)(q32:q21), встречающаяся в 80% случаев. На длинном плече хромосомы 14 находится ген иммуноглобулина Н (IgH), кодирующий синтез тяжелых цепей. На длинном плече хромосомы 18 локализован протоонкоген Вс1-2. В результате транслокации под влиянием гена IgH происходит гиперэкспрессия Вс1-2, белка митохондриальной мембраны, определяющего способность клетки избегать апоптоза. Важно подчеркнуть, что при этом не происходит формирования нового химерного гена (соответственно нового белка). Это не истинная трансформация, а обмен промоторами, приводящий к отложенной смерти клетки. Поэтому эта транслокация может встречаться у нормальных здоровых людей, в основном у пожилых, а также при других лимфомах. Происходит эта транслокация на пре-В-клеточной стадии. В 30% случаев она наблюдается и у больных с диффузной крупноклеточной лимфомой.

В диагностической практике пользуются обычно пробой фирмы "Abbott-Vysis" двухцветной с двойным слиянием. В этой пробе ген IgH дает зеленое свечение, а ген Bc1-2 — оранжевое свечение (см. рис. 20, на вклейке). В ядрах, в которых оба гена находятся в нормальном положении, выявляется 4 сигнала: 2 зеленых и 2 оранжевых. При транслокации (14;18)(q32;q21) выявляются 2 слитных (желтых) и 2 раздельных (1 оранжевый, 1 зеленый) сигнала (см. рис. 21, на вклейке).

При ФЛ могут быть и другие транслокации, например (2;8)(pll;q21) и (18;22)(q21;qll), считающиеся эквивалентом (14;18)(q32;q21).

#### Лимфома зоны мантии

Это В-клеточная лимфома, возникающая из наивных клеток прегерминальных центров. Составляет примерно 2-10% всех неходжкинских лимфом. За последнее десятилетие наблюдается повышение ее частоты. Заболевание характеризуется плохим прогнозом и рефрактерностью к терапии. Морфологически существует в виде двух вариантов — классического и бластоидного. Наиболее характерный иммуногистохимический признак — положительная реакция на СД5, а характерный цитогенетический признак — t(11;14)(q13;q32). При этой транслокации также не возникает слияния генов, а имеет место обмен промоторов, в результате которого ген IgH усиливает экспрессию гена Вс1-1, локализующегося на длинном плече хромосомы 11. За этим следует активация гена PRAD (CCND1). локализующегося в точке разрыва, что приводит к гиперэкспрессии белка циклина D1. Последний способствует переходу клеток из фазы G1 в фазу S и тем самым к их бесконтрольному росту. Эта транслокация не является абсолютно специфичной для лимфомы зоны мантии и встречается при других системных заболеваниях крови, таких, как плазмоклеточный лейкоз, ХЛЛ и др. Таким образом, результаты FISH-реакции должны оцениваться в контексте всей клинико-морфологической картины заболевания.

Для идентификации t(ll;14)(ql3;q32) используется проба фирмы "Abbott-Vysis" двухцветная с двойным слиянием. В этой пробе CCND1 флюоресцирует оранжевым цветом, а IgH — зеленым цветом (см. рис. 22, на вклейке). В клетках, где эта транслокация отсутствует, выявляются 4 раздельных сигнала — 2 оранжевых, 2 зеленых, при положительной реакции — 2 слитных (желтых) сигнала и 2 раздельных (1 зеленый и 1 красный) (см. рис. 23, на вклейке).

# Лимфома Беркитта

Это В-клеточная лимфома из мелких лимфоцитов с нерасщепленными ядрами. Выделяют три вида лимфомы Беркитта — эндемический (африканский), спорадический и связанный с иммунодефицитом. Микроскопически имеет характерный вид, состоит из разрастаний мономорфных средних размеров клеток с базофильной цитоплазмой, с округлыми, нерасшепленными ядрами и базофильными ядрышками, среди которых определяются макрофаги с включениями в цитоплазме ("звездное небо").

Патогномоничным цитогенетическим нарушением при лимфоме Беркитта является транслокация (8;14)(q24;q32), реже встречаются варианты (2;8)(p12;q24) и (8;22)(q24;q11). Транс-

локация затрагивает ген с-тус, онкоген человека, являющийся клеточным гомологом птичьего ретровируса. Белок, кодируемый этим геном, регулирует клеточный рост и дифференцировку, вызывает пролиферацию даже при отсутствии факторов роста.

Ген с-тус локализуется на длинном плече хромосомы 8 (8q24). При лимфоме Беркитта транслокация происходит таким образом, что этот ген оказывается рядом или с геном тяжелых цепей иммуноглобулина — IgH (в 75—85% случаев), или с геном легких цепей иммуноглобулина каппа IgK (2;8)(pl2;q24) (в 5—15% случаев), или с геном легких цепей иммуноглобулина ламбда — IgL (8;22)(q24;qll) (в 10% случаев). Все три варианта транслокации приводят к гиперактивности гена с-тус, поскольку он оказывается приближенным к энхансеру (специфической последовательности нуклеотидов, многократно усиливающей транскрипцию генов).

При лимфоме Беркитта существует и сложная тройная транслокация (8; 14; 18). Для диагностики лимфомы Беркитта в нашей лаборатории применяются две пробы. Первая определяет транслокацию (8;14)(q24;q32) (см. рис. 24, на вклейке). Проба трехцветная, в норме в интерфазных ядрах видно 6 сигналов: 2 оранжевых, 2 зеленых и 2 аква. При транслокации будут видны 2 слитных (желтых) сигнала, 2 аква и по 1 оранжевому и зеленому сигналу (см. рис. 25, на вклейке). Вторая проба гибрид изуется к участку 8q24, где находится основное множество точек разлома, характерных для двух транслокаций — (2;8)(p12;q24) и (8;22)(q24;q11). Проба двухцветная (см. рис. 26, на вклейке). При отсутствии транслокации в ядрах видны 2 слитных (желтых) сигнала. При наличии транслокации появляются 1 слитный и 2 раздельных сигнала — оранжевый и зеленый (см. рис. 27, на вклейке).

Следует помнить, что указанная вторая проба в строгом смысле слова дает представление лишь о состоянии участка 8q24, поэтому в интерфазных ядрах положительная реакция может наблюдаться при обеих транслокациях. Различить их можно только при использовании метафазных пластинок.

# Лимфома маргинальной зоны

Этот вид лимфомы встречается в трех основных клиниконозологических вариантах: нодальная, экстранодальная (МАLТ-лимфома) и спленическая. Состоит из клеток типа центроцитов с плазмоцитарной дифференцировкой или без нее. В слизистых оболочках она ассоциирована с очагами дистрофически-некротического изменения эпителия — лимфоэпителиальным поражением. Характеризуется разнообразными цитогенетическими нарушениями — как изменением числа хромосом (трисомии хромосом 3,18 и др.), так и транслокациями. При лимфоме маргинальной зоны описаны 4 транслокации - t(ll;18)(q21;q21), t(l;14)(p22;q32), t(14;18)(q32;q21) и t(3;14)(p14.1;q32). Разные виды транслокаций неодинаково часто встречаются в разных органах. Так, например, t(ll;18)(q21;q21) обычно определяется в MALT-лимфоме желудка, легкого и придатков глаза, t(3;14)(p14.1;q32) — в щитовидной железе. При нодальной форме указанные транслокации очень редко выявляются. Кроме того, они еще и появляются на разных стадиях болезни, например t(ll;18(q21;q21) чаще определяется на более поздней стадии заболевания.

В транслокации (II;18)(q21;q21) участвуют 2 гена — API2, локализующийся на Ilq21, и ген MALT 1 — на 18q21. В результате транслокации формируется слитный ген, который кодирует белок, активирующий NFkappaB, что приводит к резистентности к апоптозу и бесконтрольной пролиферации лимфоцитов.

Для выявления данной транслокации предложены две пробы. Одна двухцветная с двойным слиянием, а другая основана на выявлении точки отрыва (break apart) (см. рис. 28, 29, на вклейке). При применении первой пробы в нормальных клетках выявляется 4 сигнала (2 оранжевых и 2 зеленых), а при транслокации — 2 слитных и 2 раздельных (1 оранжевый и 1 зеленый) (см. рис. 30, a,  $\delta$ , на вклейке). При использовании пробы break apart в отсутствие транслокации видны 2 слитных сигнала, при транслокации — 1 слитный и 2 раздельных (1 оранжевый, 1 зеленый) сигнала (см. рис. 30, a, на вклейке).

В транслокации (I;14)(p22;q32) участвуют гены Bcl-10 (1p22) и IgH (14q32). При этом затрагивается функция промотора гена Bel-10. Данная транслокация встречается редко. С помощью FISH-реакции она рутинно не определяется.

В транслокации (14;18)(q32;q21) участвуют гены IgH (14q32) и MALT1 (18q21). В результате происходит усиление функции гена MALT1 и в конечном итоге — также активация NFkappaB. Для диагностики транслокации (14;18)(q32;q21) существует проба фирмы "Abbott-Vysis" двухцветная с двойным слиянием (см. рис. 31, на вклейке). В нормальной клетке определяются 4 сигнала, при транслокации — 2 слитных и 2 раздельных.

В транслокации (3;14)(pl4.1;q32) участвуют гены FOXP1 (3p14.1) и IgH (14q32). Коммерческой пробы для FISH-реакции пока нет.

Ограничимся вышеприведенными примерами для гематологических опухолевых процессов и перейдем к рассмотрению диагностических возможностей FISH-реакции при солидных опухолях человека.

#### 2. Применение FISH-реакции при солидных опухолях человека

При исследовании солидных опуходей чедовека большое значение имеет диагностика увеличения числа копий генов их амплификация. Для того чтобы правильно определить амплификацию гена, необходимо более детально ознакомиться с некоторыми механизмами этого процесса, о которых мы вскользь упомянули выше. По одной из наиболее принятых гипотез механизма амплификации увеличение числа копий гена происходит экстрахромосомально. К хромосоме снаружи пристраиваются нуклеотилы, воспроизводящие ту или иную последовательность, причем многократно. После окончания синтеза нуклеотиды свободно плавают в кариоплазме в виде так называемых двойных штрихов, или двойных ацентрических хромосом (double minutes). Впоследствии они могут вновь инкорпорироваться в структуру хромосомы, причем в произвольно выбранной позиции. На самой хромосоме амплифицированный участок равномерно окрашен и не имеет исчерченности — это так называемые гомогенно окрашиваюшиеся участки (ГОУ). Вполне можно допустить, что в отдельных случаях амплификация начинается на хромосоме и там же заканчивается формированием ГОУ. Могут сосуществовать оба вида амплификации. Для клинического патолога эти детали могут иметь большое значение, поскольку двойные штрихи — это ранний феномен амплификации, а ГОУ поздний. Более того, по имеющимся данным, часть амплифицированных генов в виде двойных штрихов может быть элиминирована из клетки, т. е. эффект амплификации может быть редуцирован, что отразится на клиническом течении процесса (см. рис. 32, на вклейке). Результаты FISH-реакции, поставленной для установления амплификации гена, позволяют с определенной долей достоверности различать двойные штрихи и ГОУ. Первые имеют вил мелких, беспорядочно разбросанных в кариоплазме частиц, а вторые — более однородные линейные участки флюоресценции на самой хромосоме. Еще более демонстративна эта разница при постановке FISHреакции на метафазных пластинках. При этом двойные штрихи лежат между хромосомами. Однако на обычных интерфазных ядрах начинающий специалист увидит большее число светящихся точек, чем это предусмотрено конструкцией данной пробы. Важно помнить, что само по себе увеличение числа сигналов не говорит об амплификации гена. Оно может наступить в результате полисомии. Поэтому каждая проба должна включать дополнительный сигнал, обычно центромерный, который позволяет установить истинное число хромосом, а полученные величины сигналов гена необходимо пересчитать на 1 хромосому.

Наиболее распространенными генами, амплификация которых важна для клинициста, являются Her2/neu и n-myc.

#### Her2/neu

Нег2/пеи является геном из семейства рецепторов эпидермального фактора роста и кодирует белок, локализующийся трансмембранно и являющийся тирозинкиназным рецептором. Первоначально этот ген был изучен при эритробластозе кур (erb), а его аналог у человека был назван Her [H (Human) + erb = Her]. Продукт этого гена является мишенью для моноклонального антитела с фармакопейным названием "герцептин". Герцептин назначается больным при наличии амплификации гена Нег2/пеи. Для установления амплификации гена Her2/neu разработано несколько метолик: иммуногистохимическое определение продукта этого гена, CFISH (хромогенная реакция) и др., однако FISH-реакция остается "золотым стандартом". Обычно поступают следующим образом. Вначале проволят иммуногистохимическое определение белка Her2/neu с оценкой степени экспрессии. При отрицательной или положительной реакции исследование на этом заканчивают. При неопределенном результате переходят к FISH-реакции.

FISH-реакцию на Her2/neu можно поставить на разных видах материала, однако чаще используют парафиновые срезы. Реактив для Her2/neu содержит наряду с нуклеотидными последовательностями гена (оранжевого цвета) центромерную пробу на хромосому 17 (зеленого цвета) (см. рис. 33—35, на вклейке). По существующей инструкции надо сосчитать число сигналов в 20 опухолевых клетках и вычислить соотношение числа сигналов ген/центромера. Изначально считалось, что об амплификации следует говорить тогда, когда этот коэффициент составляет 2 и более. В последнее время критерием амплификации считают коэффициент более 2.2. Следует отметить, что считать сигналы приходится сравнительно редко. Чаще амплификация имеет вид двойных штрихов. Амплификация в виде наличия только ГОУ бывает гораздо реже. С учетом вышеприведенных данных о механизмах амплификации случаи с изолированной амплификацией по типу ГОУ представляют особый интерес. Установлено, что не всякая клетка с амплификацией Her2/neu гиперэкспрессирует продукт этого гена. Согласно принятой точке зрения, ампликоны гена Her2/neu в виде двойных штрихов инкорпорируются обратно из кариоплазмы в хромосому, но не обязательно в хромосому 17. На другой же хромосоме они оказываются вне необходимых промоторов и поэтому неактивны. Это обстоятельство следует иметь в виду при интерпретации расхождений результатов (кажушихся) разных методов исследования состояния гена Her2/neu.

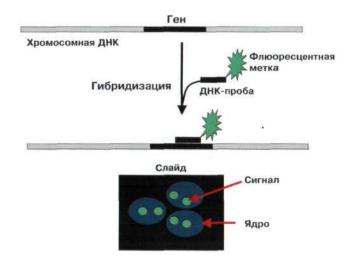


Рис. 1. Принцип FISH-реакции.

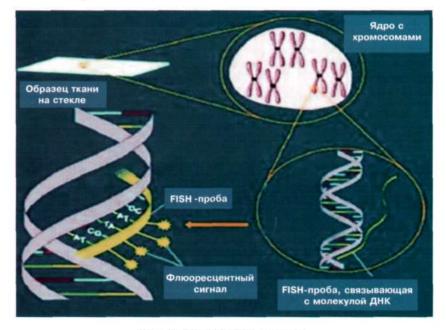


Рис. 2. Схема FISH-реакции.

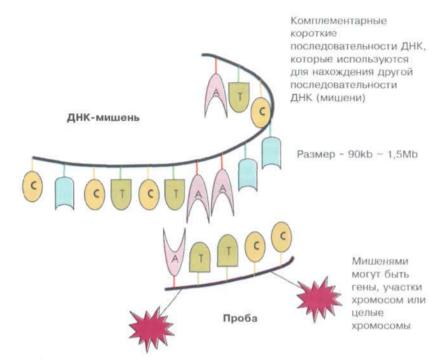


Рис. 3. Схема строения пробы для FISH-реакции.

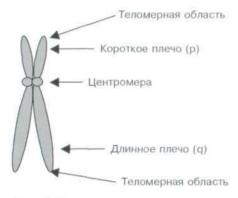


Рис. 4. Схема структуры хромосомы.



Рис. 5. Типы проб для разных участков хромосом.

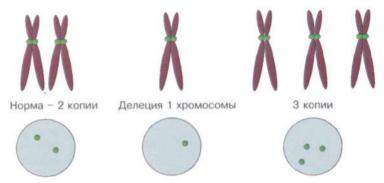


Рис. 6. Типы сигналов при использовании центромерных проб (СЕР).

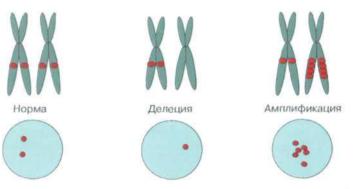


Рис. 7. Типы сигналов при использовании локусспецифических проб (LSI). Локусспецифическая проба окращена в красный цвет.

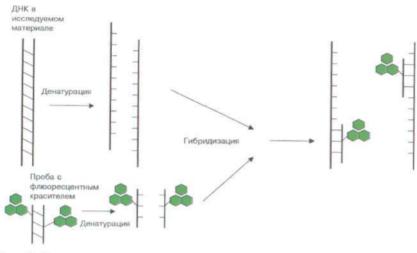


Рис. 8. Схема денатурации и гибридизации ДНК-пробы с хромосомой.

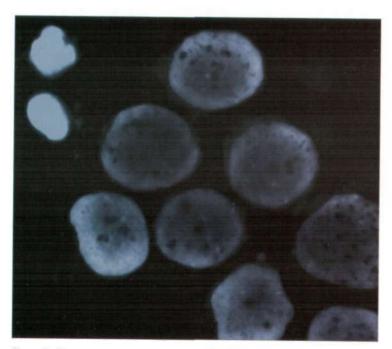


Рис. 9. Вид клеток, окрашенных DAPI. Контуры ядер ровные, цитоплазмы не видно, текстура ядер равномерная.



Рис. 10. Типы генетических нарушений, устанавливаемых с помощью FISH-реакции.

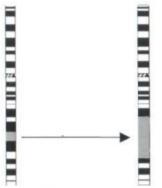


Рис. 11. Схема формирования гомогенно окрашивающегося участка.

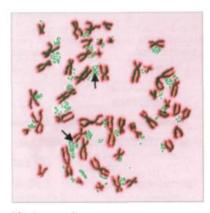


Рис. 12. Амплификация гена по механизму формирования двойных ацентрических хромосом (указаны стрелками).

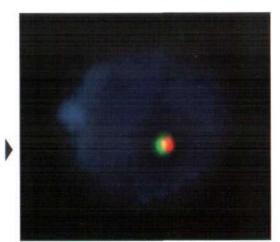


Рис. 13. Формирование флюоресцентного сигнала при транслокации.

Здесь и далее, кроме отдельно оговоренных случаев, сигнал красного цвета соответствует оранжевой флюоресценции в микроскопе.

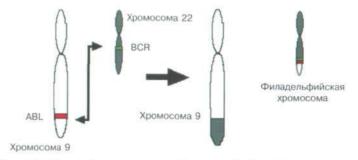
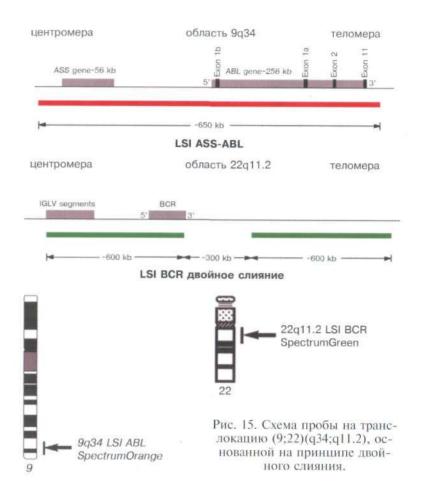


Рис. 14. Схема формирования филадельфийской хромосомы.



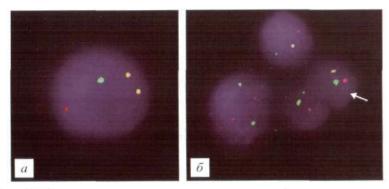
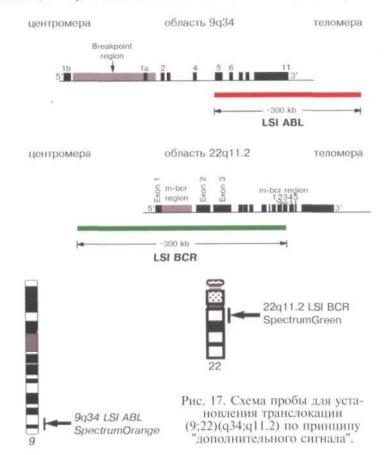


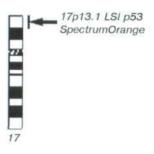
Рис. 16. Транслокация при хроническом миелолейкозе, определяемая разными пробами.

a — проба с использованием принципа "дополнительного сигнала" с 1 слитным сигналом;  $\delta$  — проба с двойным слиянием, с 2 слитными (желтыми) сигналами.

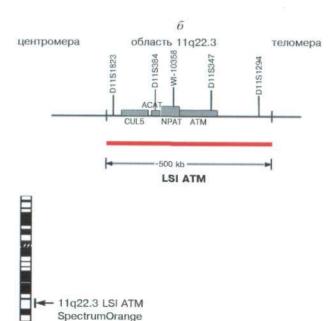








11



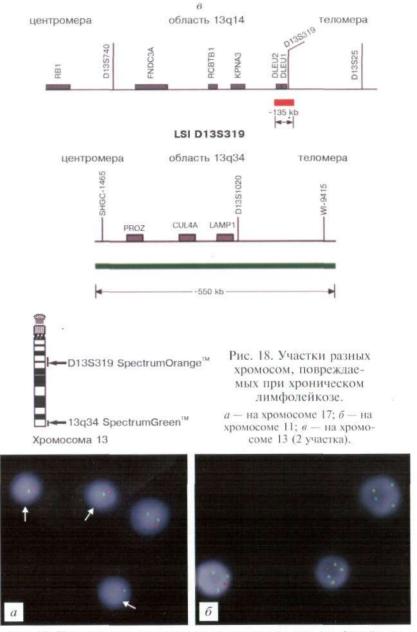
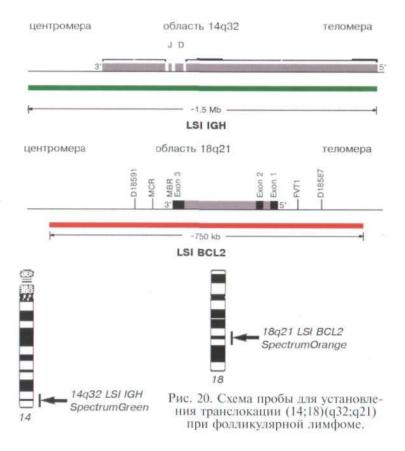


Рис. 19. Хромосомные нарушения при хроническом лимфолейкозе. a — делеция участков 17q (1 оранжевый сигнал) и 11q (1 зеленый сигнал) (двухняетная проба);  $\delta$  — трисомия хромосомы 12 (3 зеленых сигнала), делеции локусов 13q14 (1 оранжевый сигнал), 13q34 (1 аква сигнал) (трехцветная проба).



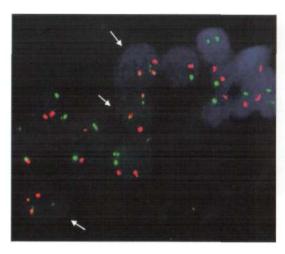


Рис. 21. Положительная реакция на транслокацию (14;18)(q32;q21) при фолликулярной лимфоме (2 слитных, 2 раздельных сигнала).

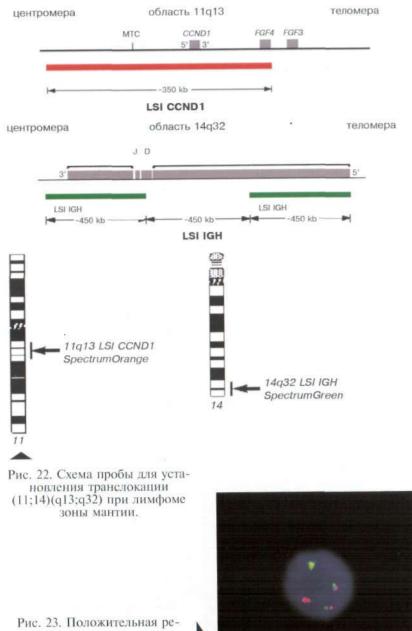
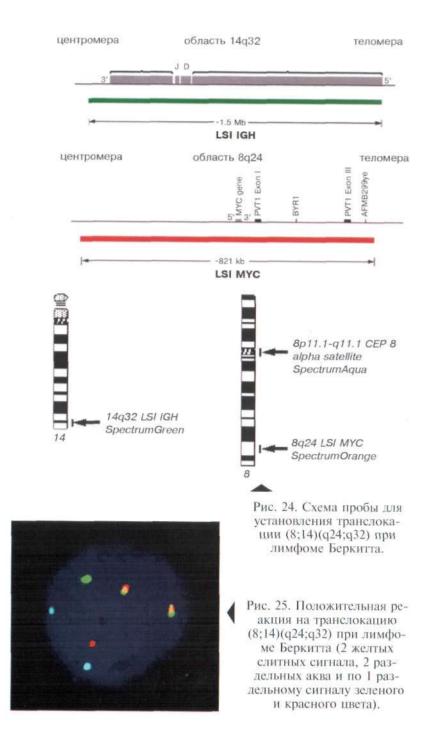


Рис. 23. Положительная реакция на транслокацию (11;14)(q13;q32) при лимфоме зоны мантии (2 слитных, 2 раздельных сигнала).



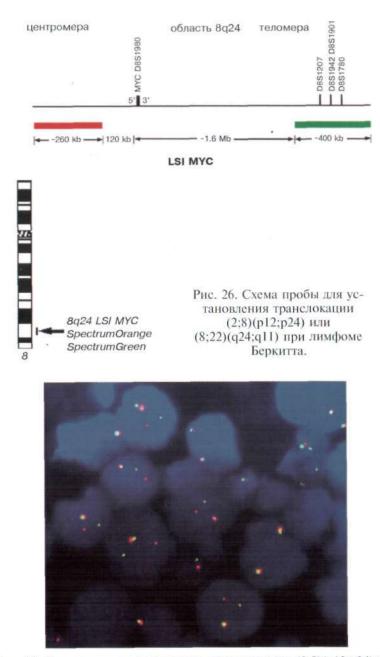


Рис. 27. Положительная реакция на транслокацию (2;8)(p12;q24) или (8;22)(q24;q11) при лимфоме Беркитта (1 слитный, 2 раздельных сигнала).

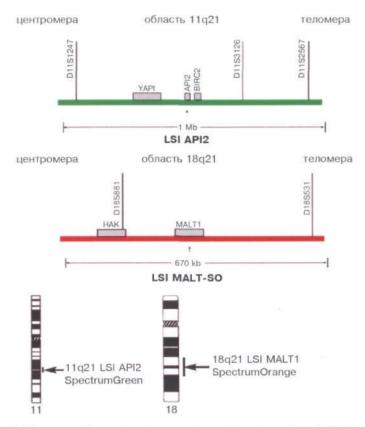


Рис. 28. Схема пробы для установления транслокации (11;18)(q21;q21) с двойным слиянием при лимфоме маргинальной зоны.

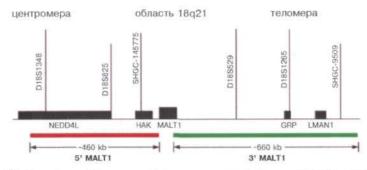


Рис. 29. Схема пробы для установления транслокации (11;18), основанной на принципе break apart (точки отрыва) при лимфоме маргинальной зоны.

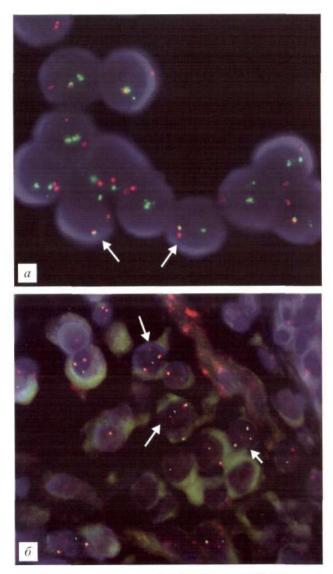


Рис. 30. Транслокация (11;18)(q21;q21) при МАLТ-лимфоме. a-c применением пробы, основанной на принципе break apart (точки отрыва) (1 слитный, 2 раздельных сигнала);  $\delta-c$  применением пробы с двойным слиянием (2 слитных желтых, 2 раздельных сигнала).

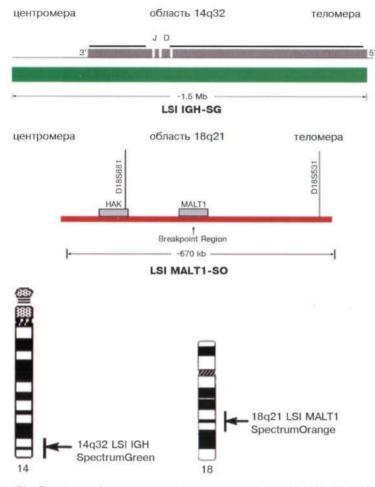
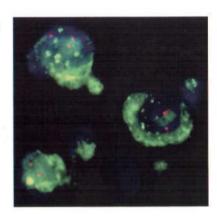


Рис. 31. Схема пробы для установления транслокации (14;18)(q32;q21) при лимфоме маргинальной зоны.

Рис. 32. Возможная экструзия ампликонов гена *n-тус*. Обратить внимание на скопления разрушенных ампликонов по периферии ядер и в отпочковавшихся участках.



тен Her2/neu

-190 kb
LSI HER-2

17p11.1-q11.1 CEP17
alpha satellite
SpectrumGreen
17q11.2-q12 LSI HER-2/neu
SpectrumOrange

Рис. 33. Схема расположения гена Her2/neu на хромосоме 17.

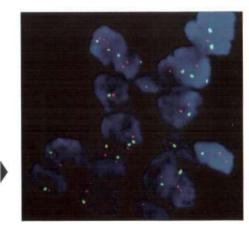


Рис. 34. Отсутствие амплификации гена *Her2/neu* в клетках рака молочной железы (примерно равное число сигналов в каждом ядре).

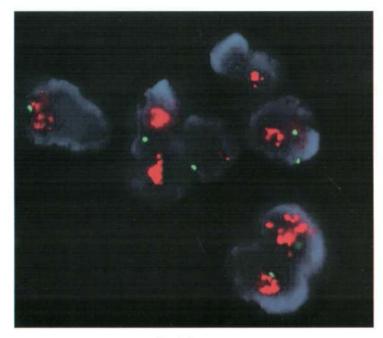


Рис. 35. Амплификация гена Her2/neu в клетках рака молочной железы.

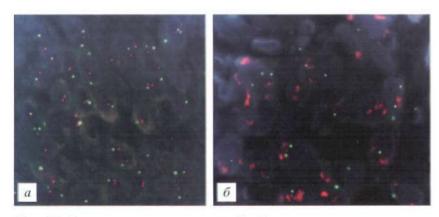


Рис. 36. Сопоставление статуса гена *Her2/neu* в первичном очаге рака молочной железы и в его метастазе.

a — отсутствие амплификации гена  $\mathit{Her2/neu}$  в первичном очаге рака молочной железы;  $\delta$  — амплификация гена  $\mathit{Her2/neu}$  в метастазе рака той же больной.

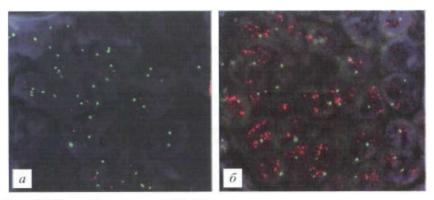


Рис. 37. Разный статус гена *Her2/neu* при синхронном двустороннем раке молочной железы.

a — отсутствие признаков амплификации в клетках рака левой молочной железы;  $\delta$  — амплификация этого гена в клетках рака правой молочной железы.

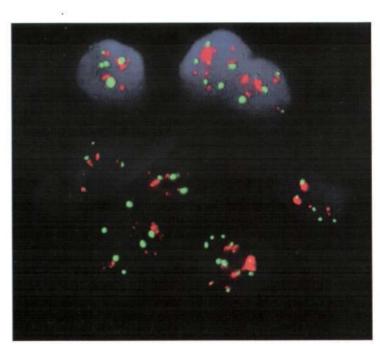


Рис. 38. Полисомия хромосомы 17 в клетках рака молочной железы.

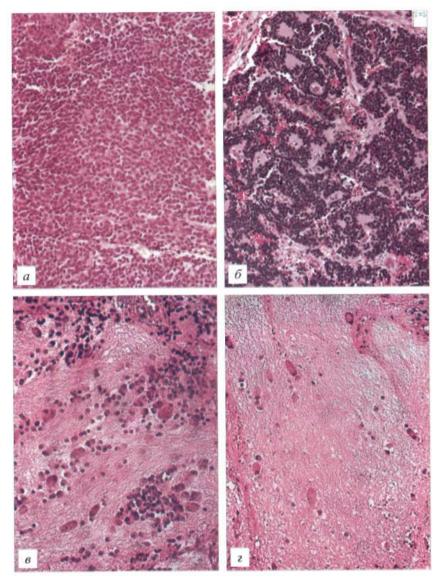
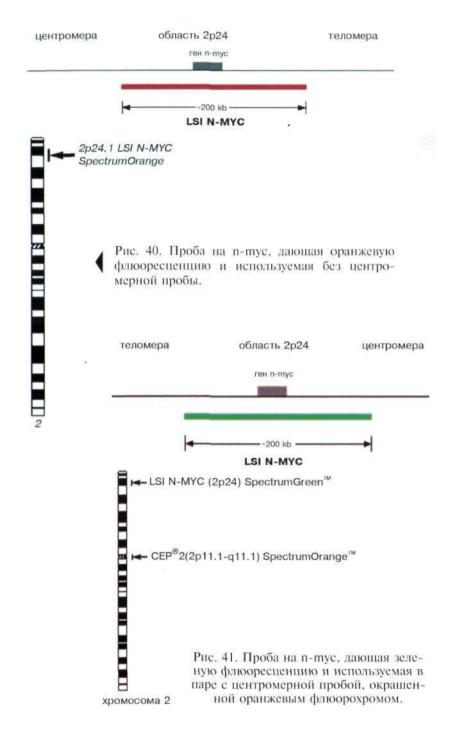


Рис. 39. Разные варианты морфологической структуры нейробластомы, отражающие повышение степени дифференцировки в ряду симпатогониома  $(a) \rightarrow$  симпатобластома  $(\delta) \rightarrow$  ганглионейробластома  $(\theta) \rightarrow$  ганглионейрома  $(\epsilon)$ . Окраска гематоксилином и эозином.



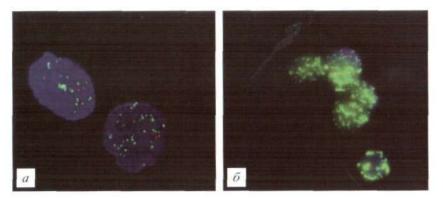


Рис. 42. Амплификация гена n-mуc в клетках нейробластомы. a — в виде гомогенно окрашивающихся участков;  $\delta$  — с преобладанием двойных ацентрических хромосом.

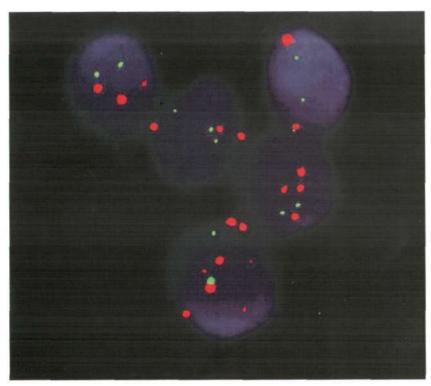


Рис. 43. Полисомия хромосомы 2 (большое число центромерных сигналов красного цвета) в клетках нейробластомы без признаков амплификации гена *n-myc*.

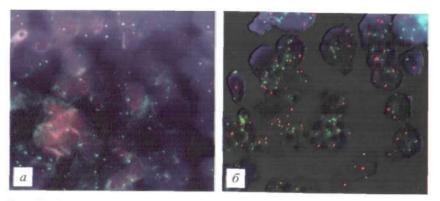


Рис. 44. Сопоставление статуса гена *n-myc* в первичном очаге нейробластомы и в его рецидиве.

a — отсутствие амплификации гена n-myc в первичном очаге;  $\delta$  — амплификация гена n-myc в рецидивной опухоли.

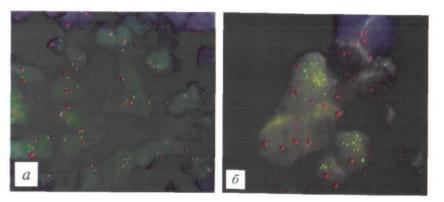
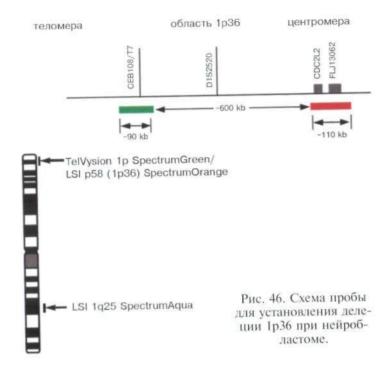


Рис. 45. Разный статус гена *n-тус* в первичном и метастатическом очагах нейробластомы.

a — отсутствие амплификации гена n-myc в первичном очаге;  $\delta$  — амплификация гена n-myc в метастазе той же опухоли.



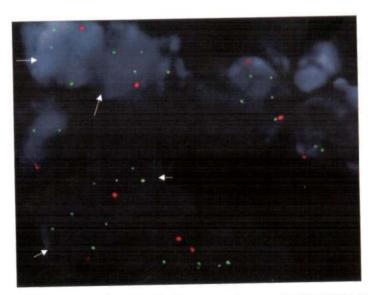
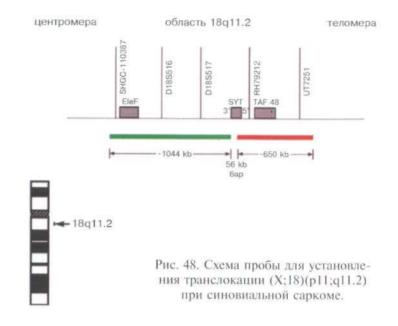


Рис. 47. Делеция 1р36 при нейробластоме: 1 оранжевый сигнал в большинстве опухолевых клеток.



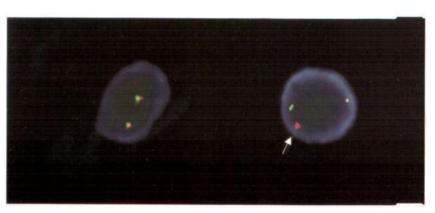


Рис. 49. Положительная FISH-реакция на транслокацию (X;18)(p11;q11.2) при синовиальной саркоме (1 слитный, 2 раздельных сигнала).

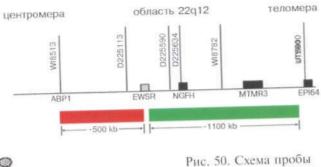




Рис. 50. Схема пробы для установления транслокации (11;22)(q24;q12) при опухолях семейства саркомы Юинга.

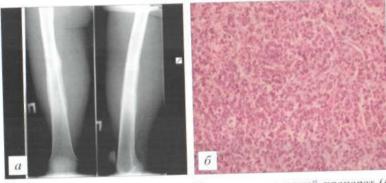


Рис. 51. Рентгеновский снимок (a) и гистологический препарат (б) больного с типичной саркомой Юинга.

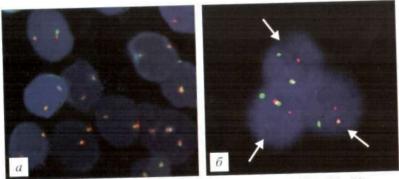


Рис. 52. FISH-реакция на транслокацию (11;22)(q24;q12).

a — отрицательная реакция в контроле (во всех ядрах по 2 слитных сигнала);  $\delta$  — положительная реакция в клетках типичной саркомы Юинга (1 слитный и 2 раздельных сигнала в каждом ядре).

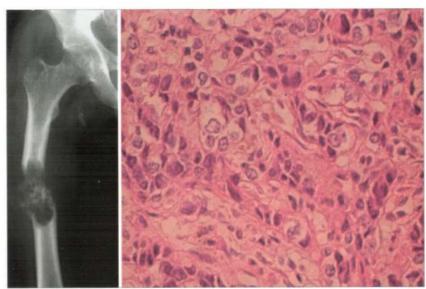


Рис. 53. Рентгеновский снимок (a) и гистологический препарат (б) больного с опухолью бедренной кости неясного генеза.

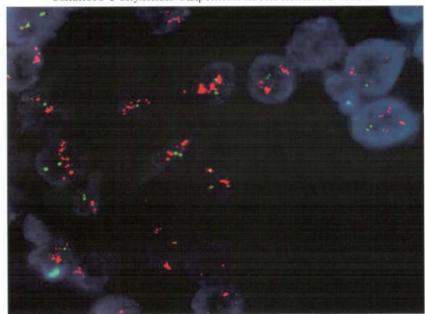


Рис. 54. Положительная FISH-реакция на транслокацию (11;22)(q24;q12) с одновременной амплификацией проксимального участка гена 22q12 у того же больного (обращает внимание на большое число оранжевых сигналов).

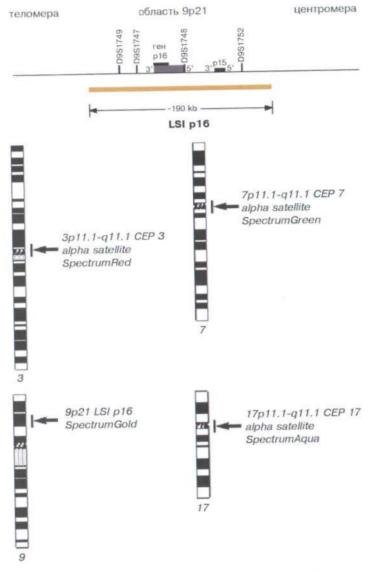


Рис. 55. Схема локусов хромосом, наиболее часто затрагиваемых при раке мочевого пузыря, на хромосомах 3, 7, 19 и 9.

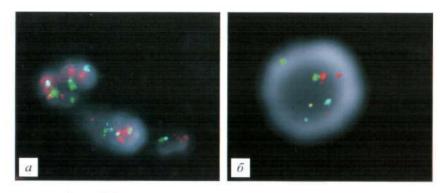


Рис. 56. Разная степень сохранности уротелия в моче. a — клетки сморщенные, с нечеткими контурами;  $\delta$  — сохранная клетка.

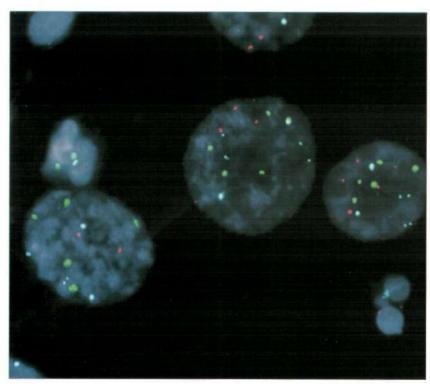


Рис. 57. Клетки рака в смыве из мочевого пузыря (в каждом ядре по 3 и более сигналов разного цвета).

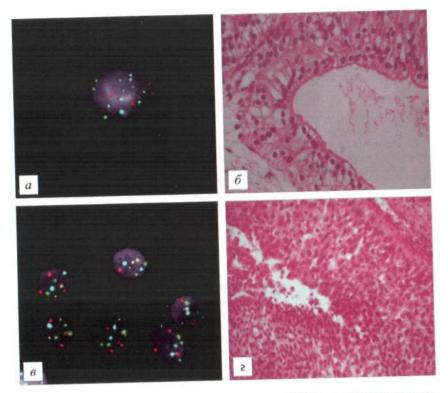


Рис. 58. Дискордантность между результатами FISH-реакции на клетках опухоли мочевого пузыря и гистологической структурой и степенью дифференцировки опухоли.

a — клетки рака с множественными хромосомными аномалиями;  $\delta$  — гистологическая структура соответствующей опухоли — высокодифференцированного рака; a — клетки рака с минимальными хромосомными аномалиями (трисомия хромосомы  $\beta$  — красные сигналы и хромосомы  $\beta$  — зеленые сигналы);  $\epsilon$  — гистологическая структура той же опухоли — рака низкой степени дифференцировки.

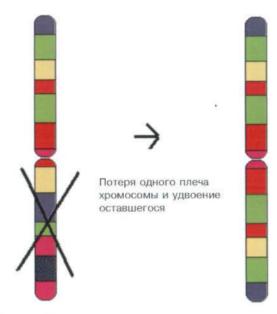


Рис. 59. Механизм формирования изохромосомы.

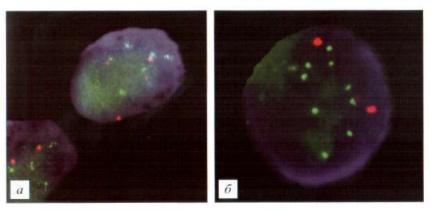


Рис. 60. Амплификация генетического материала короткого плеча хромосомы 12 (зеленые сигналы) в герминогенных опухолях яичка  $(a, \delta)$ .

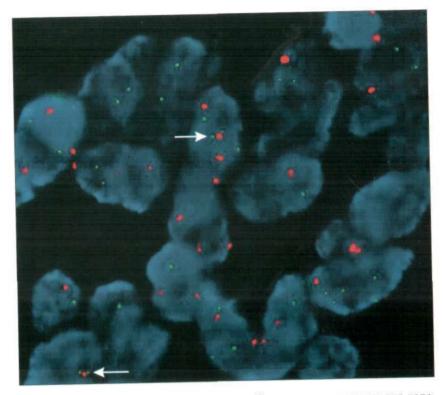
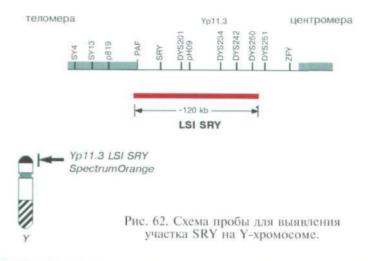


Рис. 61. Изохромосома 12р в семиноме. Стрелка указывает на два зеленых сигнала, расположенных симметрично по отношению к красному центромерному сигналу.



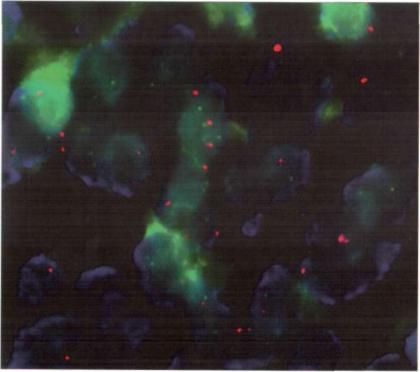


Рис. 63. Наличие участка SRY в гранулезоклеточной опухоли яичка (оранжевые сигналы), что одновременно с отсутствием женского кариотипа в этих клетках доказывает их генез из стромальных клеток собственно яичка, а не из дистопированных элементов.

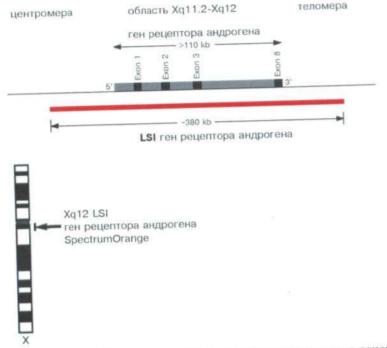


Рис. 64. Схема пробы для установления состояния локуса гена рецеп<sub>то-</sub> ра андрогенов на X-хромосоме.

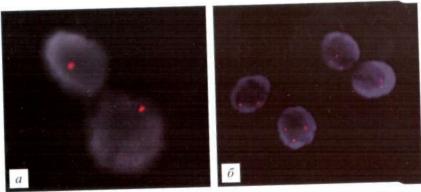


Рис. 65. Амплификация гена рецептора андрогенов в процессе тера $_{\Pi H H}$  рака предстательной железы антиандрогенами. a- по 1 оранжевому сигналу в клетках рака предстательной железы до лече $_{\Pi H H}$ ;  $\delta-$  увеличение числа сигналов в процессе терапии.

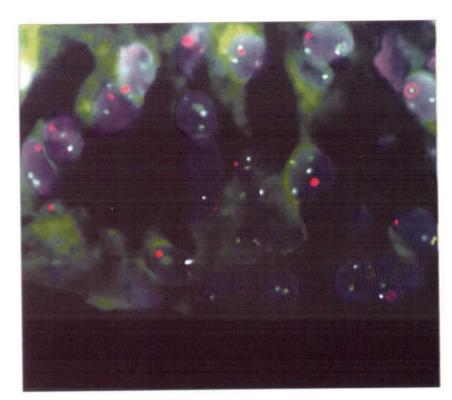


Рис. 66. Кариотип XY в клетках стромы яичника (Y-хромосома — оранжевая флюореспенция) одновременно с трисомией X-хромосомы (зеленые сигналы) при преждевременном угасании его функции.

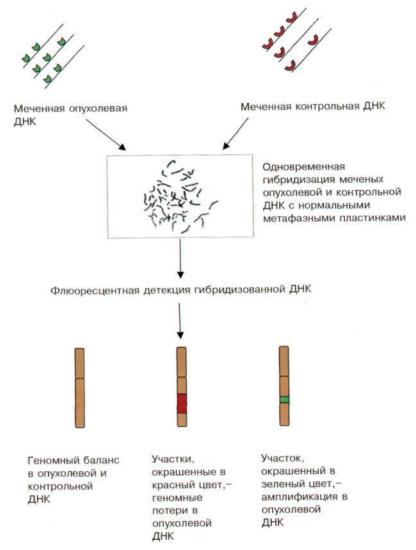


Рис. 67. Принципиальная схема сравнительной геномной гибридизации.

дифференцироваться (созреть) до зрелого ганглиоцита, и на этом пути клетки проходят 4 стадии, соответствующие опухолям разной микроскопической структуры, особенно различаюшиеся по содержанию экстрацеллюлярного материала: симпатогониома, симпатобластома, ганглионейробластома, ганглионейрома (см. рис. 39. на вклейке). В современных классификациях первые два варианта объединяются в одну группу — собственно нейробластому — с учетом незрелых клеток и доли стромальных элементов. Лля лиагностики амплификации гена п-тис существуют две пробы, которые выпускает фирма "АЬbott-Vvsis". Олна проба солержит только метку на ген n-mvc и дает флюоресценцию оранжевого цвета (см. рис. 40, на вклейке), другая содержит метку как для гена n-mvc (зеленую), так и для а-сателлитного участка хромосомы 2 (оранжевую) (см. рис. 41, на вклейке). В нормальном ядре результат гибридизации проявляется в виде 2 зеленых и 2 оранжевых сигналов. До сих пор нет четких количественных параметров для оценки степени амплификации гена n-myc. Ранее выделяли амплификацию низкой и высокой степени, принимая за амплификацию наличие даже трех лишних копий гена. В настоящее время склоняются к числу 10 (при 2 центромерных сигналах), но, на наш взгляд, все же сигналов должно быть еще больше.

Если опыт специалиста позволяет, желательно уточнить характер амплификации гена n-myc — в виде двойных штрихов или ГОУ (см. рис. 42, на вклейке). Последние прогностически менее благоприятны, чем наличие ядер с двойными штрихами, поскольку, как уже было указано выше, избыток амплифицированного гена может быть удален из клетки (экструзия) и тем самым эффект амплификации значительно снижен (см. рис. 32, на вклейке).

Небольшое число копий гена n-myc может быть не связано с амплификацией: во-первых, иногда формируются изохромосомы 2р, а во-вторых, происходят несбалансированные транслокации короткого плеча хромосомы 2. Приводим несколько моментов, которые должны быть учтены специалистом, выполняющим FISH-реакцию.

- 1. Ганглионейрома не сопровождается амплификацией гена n-myc, поэтому не является объектом изучения, хотя некоторые клиницисты по незнанию настаивают на этом.
- 2. Очень осторожно надо оценивать результаты исследования ганглионейробластомы. Микроскопическая структура этого варианта опухоли чрезвычайно пестрая и требует детального изучения каждого индивидуального случая на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Регистрировать сигналы следует в мелких округлых ядрах незрелых клеток. Более крупные клетки, созревающие в ганглиоциты, проходят стадию полиплоидизации и без строгого учета числа

центромерных сигналов могут быть ошибочно расценены как клеточные элементы с амплификацией гена n-myc (см. рис. 43, на вклейке).

3. В случае линамического наблюления за больными желательно провести FISH-реакцию на материале, полученном на разных этапах лечения больного, — рецидивах, метастазах. Сопоставление состояния гена n-myc в динамике позволяет более объективно оценить прогностическое значение этого фактора, и, главное, оценка должна проводиться в контексте всей микроскопической картины болезни на конкретном этапе. Мы располагаем наблюдениями, аналогичными вышеприведенным наблюдениям за больными раком молочной железы, когла имелось различие по числу копий гена n-myc в рецидивных опухолях и метастазах по сравнению с первичным очагом болезни (см. рис. 44, 45, на вклейке). В клиническом аспекте следует также помнить, что не всегда степень амплификации (вплоть до ее отсутствия) коррелирует с прогнозом. Как выясняется, во многом такие расхождения обусловлены степенью экспрессии гена на уровне РНК или белка, исследования которой выходят за рамки целей данной работы и проводятся в настоящее время только в отдельных специализированных молекулярно-генетических лабораториях.

Для установления прогноза при нейробластоме используется и другая реакция, выявляющая делецию короткого плеча хромосомы 1 (1р36). Результат этой делеции прогностически весьма неблагоприятен, поскольку предположительно связан с потерей пока не идентифицированного гена-супрессора. локализующегося в этом участке. Имеющаяся проба является трехиветной и гибридизируется к участкам 1р36 (оранжевая). 1р теломерному (зеленая) и 1д25 (аква) (см. рис. 46, на вклейке). В нормальном интерфазном ядре в результате гибридизации получается по 2 оранжевых, 2 зеленых и 2 аква сигналов. При микроделеции 1р36 определяются 1 оранжевый. 1 зеленый и 2 аква сигнала (редко при наличии интерстициальной делеции 1 оранжевый, 2 зеленых и 2 аква сигнала) (см. рис. 47, на вклейке). На срезах результаты не очень демонстративны (нужно сосчитать большое число не перекрывающих друг друга ядер). В тех случаях, когда это возможно, лучше проводить реакцию на мазках-отпечатках. Особое значение придают результатам этой реакции для предсказания рецидивов опухоли.

Проба на увеличение числа копий 17q, также характерное для нейробластомы, на практике применяется редко.

#### Определение транслокации при саркомах мягких тканей

#### Синовиальная саркома

Это олна из часто встречающихся мягкотканных опухолей человека. Название этого новообразования является чисто историческим, поскольку связь опухоли с синовиальной оболочкой в настоящее время окончательно отвергнута. Более того, синовиальная саркома — единственная опухоль, нозологическая спецификация которой происходит с учетом генетических нарушений, в частности специфической транслокации между хромосомой 18 и женской половой хромосомой t(X;18)(pll;qll). Рассмотрим механизм транслокации при синовиальной саркоме. В транслокации участвуют ген SYT. локализующийся на длинном плече хромосомы 18, и гены SSX1 (варианты SSX2, SSX4), являющиеся представителями семейства генов, находящихся на Х-хромосоме и отличающихся друг от друга точкой разрыва. Слитный химерный ген, формирующийся при транслокации, кодирует белок, который является регулятором транскрипции и активирует протоонкогены или ингибирует супрессоры. Клинико-биологические свойства синовиальной саркомы определяются продуктом новообразованного химерного гена. Доказано, что морфологический вариант синовиальной саркомы зависит от варианта гена SSX, участвующего в транслокации. При наличии в слитном гене SSX1 опухоль обычно имеет бифазное строение. В монофазной опухоли возможны любые варианты гена SSX. Транслокация встречается в 90% случаев. В крупных лабораториях для диагностики синовиальной саркомы используют метод RT-PCR, что резко повышает точность диагностики.

Для FISH-реакции используется проба фирмы "Abbott-Vysis". Конструкция пробы представлена на рис. 48 (см. на вклейке). Реакцию можно ставить как на срезах, так и на мазках-отпечатках. При отрицательном результате в клетке обнаруживается 2 слитных сигнала (желтое свечение). При положительном результате определяются 1 слитный и 2 раздельных (оранжевый и зеленый) сигнала (см. рис. 49, на вклейке).

# Саркома Юинга

Саркома Юинга является мелкоклеточной круглоклеточной саркомой, входящей вместе с примитивной нейроэктодермальной опухолью, круглоклеточной десмопластической опухолью и другими опухолями в семейство саркомы Юинга. Для всех указанных новообразований характерна транслокация t(ll;22)(q24;ql2), встречающаяся в 85% случаев. При этой транслокации происходит слияние гена EWS, локализующегося на хромосоме 22, с геном FLI1 (Friend leukemia integration gene), находящимся на

хромосоме 11. Эта транслокация реципрокная и дериватный ген может формироваться на обеих хромосомах. Белок, кодируемый дериватным геном, имеет множество функций, хотя основная заключается в активации транскрипционной активности. Следует отметить, что ген EWS в 90% случаев транслоцируется с FLI1, но в остальных случаях может поменяться местами и с другими генами, например ERG, ETV1, FEV, E1AF. Чрезвычайно интересно, что слияние одного и того же гена EWS с разными генами характерно для разных нозологических вариантов сарком этого семейства. Например, в светлоклеточной саркоме мягких тканей партнером гена EWS выступает ATF1.

Проба на эту транслокацию чрезвычайно точна и чувствительна. Реакцию можно ставить на срезах, мазках, причем порой достаточно иметь в мазке небольшое число клеток. Используется проба фирмы "Abbott Vvsis" (см. рис. 50, на вклейке). Конструкция пробы следующая: оранжевой пробой помечен дистальный край гена EWS, а зеленой — проксимальный край того же гена. В норме в интерфазном ядре определяются 2 слитных желтых сигнала, при наличии транслокации в типичных случаях (см. рис. 51, на вклейке) определяется 1 слитный желтый сигнал 2 раздельных — зеленый и оранжевый (см. рис. 52, на вклейке). Иногда в ядрах наряду с типичной картиной транслокации можно увидеть большое число оранжевых сигналов. Первоначально мы принимали эти сигналы за неотмытый материал. Впоследствии после совместной работы с Европейским центром по изучению опухолей костей нами было показано, что это амплифицированные участки проксимального отдела гена EWS (см. рис. 53, 54, на вклейке). Оказалось. что эта амплификация придает своеобразие как клинической симптоматике, так и чувствительности саркомы Юинга к химиотерапии. Эти опухоли резистентны к классическим химиотерапевтическим схемам и требуют более энергичной терапии. Часто их рентгенологическая семиотика лишена типичных проявлений в виде луковичного периостоза и больше похожа на метастатическое поражение кости. Наличие указанной амплификации необходимо обязательно отметить в ответе патолога.

# Диагностика рака мочевого пузыря

Малигнизация уротелия изучается цитогенетиками давно, и имеются убедительные свидетельства существования целого ряда нарушений, в той или в иной степени характерных для разных фаз формирования злокачественных новообразований мочевого пузыря. Например, давно известно, что моносомия по хромосоме 9 — раннее явление и наблюдается у 50% боль-

ных, в то время как делеция короткого плеча хромосомы 17 поздний феномен и выявляется у 40% больных. С учетом наиболее типичных хромосомных и геномных нарушений фирма "Abbott Vvsis" выпустила набор проб, предназначенных для диагностики рака мочевого пузыря в клетках уротелия, подвергшихся эксфолиации и осаждаемых при центрифугировании мочи. Набор называется Urovision Kit и содержит смесь следующих ДНК-проб: центромерные пробы для хромосом 3, 7, 17 (СЕРЗ, СЕР7, СЕР17) и локусспецифическая проба 9р21 к короткому плечу хромосомы 9. В указанном участке на хромосоме 9 локализован ген-супрессор p16 (см. рис. 55, на вклейке). Проба СЕРЗ дает красное (на этот раз именно красное, а не оранжевое), СЕР7 — зеленое, а СЕР 17 — аква свечение, проба 9р21 — золотистое свечение. Наличие 3 сигналов и более любой из СЕР-проб в 25 клетках расценивается как признак малигнизации. Ранним признаком озлокачествления уротелия считается наличие гомозиготной делеции в участке 9р21 (отсутствие золотистого сигнала) в 12 из 25 клеток. При этом делеции подвергаются оба аллеля, поэтому сигнал в клетке целиком отсутствует.

Конструкция пробы Urovision проста, и оценка результатов не вызывает затруднений, однако сложности могут возникнуть на других этапах исследования. В частности, проба эта была предложена как скрининговая, следовательно, предполагалось искать опухолевые клетки в моче, но сохранность клеточных элементов в моче весьма низкая, особенно для FISH-исследования (см. рис. 56, на вклейке). Поэтому многие лаборатории вынуждены просить больных доставить на исследование не ночную порцию, а мочу, собранную за короткий интервал. При этом снижаются число клеток в осадке и результативность исследования. Первоначально вообще предполагалась даже пересылка образцов мочи на далекие расстояния и для этой цели предлагались разные методы презервации клеток в моче: от простых — добавление 50% этанола в равном объеме с мочой до использования полимеров — 2% полиэтиленгликоля в 50% этаноле (Carbowax) и специальных жидкостей (cytolyt, cytospin, cytoRich). К сожалению, информативность метода от этого возрастает незначительно. Другая проблема связана с особенностями макроскопического роста рака в мочевом пузыре. Папилломатозные опухоли большей частью, видимо, не эксфолируют клетки так интенсивно, чтобы исследователь мог иметь в своем распоряжении достаточно материала. По нашему опыту. хорошие результаты дает исследование промывных вод мочевого пузыря под возможным повышенным давлением (см. рис. 57. на вклейке). Все перечисленное снижает первично скрининговое значение методики Urovision. Значительно более информативно исследование мазков-отпечатков маленьких со-

скобов и биопсий слизистой мочевого пузыря. В материале, полученном таким образом, клеток всегда много и их морфология прекрасно сохранена. По нашему опыту, с использованием подобного методического подхода можно изучать множественные, мультицентричные зачатки рака, раннее возникновение рецидива, эффект БЦЖ-терапии. Кроме того, оказалось, что учет результатов реакции Urovision при уротелиальном раке помогает объективизировать степень дифференцировки опухолевых клеток. Нередки случаи, когда в клетках, лишенных черт полиморфизма и расцененных как высокодифференцированные раки, выявлялось разнообразное сочетание хромосомных аберраций, в то время как устрашающие на вид атипичные опухолевые клетки содержали небольшое число дополнительных хромосом. Клиническое значение подобных расхождений изучается, но результаты пока не обобщены. Примеры подобных клинических наблюдений с использованием FISHреакции приведены на рис. 58 (см. на вклейке).

Попытки адаптировать тест для исследования гистологических препаратов пока не всегда успешны. По-видимому, проба не предусматривает возможности использовать тканевые срезы, хотя при некоторых доработках можно получить вполне удовлетворительное свечение, пожалуй, за исключением хромосомы 3.

## FISH и герминогенные опухоли

Чрезвычайно своеобразным признаком, ассоциированным с герминогенными опухолями человека, является патология хромосомы 12. Нарушения этой хромосомы при герминогенных опухолях носят двоякий характер. Могут формироваться изохромосомы 12 с удвоением короткого плеча и одновременной потерей длинного плеча (il2p) (см. рис. 59, на вклейке) либо происходит амплификация генетического материала короткого плеча этой хромосомы. Первоначально считалось, что наличие этих нарушений свидетельствует о высокой степени злокачественности герминогенных опухолей, например повышенной склонности к метастазированию семиномы или дисгерминомы. Большую диагностическую ценность имеет обнаружение названных нарушений в ткани яичка в структурах, подозрительных на рак in situ яичек. В последнее время предпринимаются попытки использовать выявление нарушений на хромосоме 12 для дифференциальной диагностики герминогенных и негерминогенных опухолей. Тем не менее эта проба пока еще не вошла в ежедневную клиническую практику. Причин этого несколько. Во-первых, клиницисты не очень знакомы с данными цитогенетическими нарушениями. Во-вторых, коммерческая проба признается не всеми специалистами, а предпочтение отдается синтезированным в лаборатории пробам, что затрудняет последующее стандартизированное сравнение результатов, и, наконец, клинический аспект различия двух феноменов — формирования изохромосомы 12р и амплификации генетического материала на коротком плече этой хромосомы — не до конца ясен. На сегодняшний день считается, что изначально наступает амплификация генетического материала на коротком плече хромосомы 12, позже теряется длинное плечо и удваивается короткое плечо. Таким образом, оба процесса являются как бы звеньями одной и той же цепи. Действительно, во многих герминогенных опухолях, например в семиноме, у одного и того же индивидуума выявляются оба типа нарушений.

Проба выпускается раздельно в виде теломерной пробы для хромосомы 12 (12р. зеленая) и центромерной пробы для хромосомы 12 (а-сателлитная, 12pll.1-qll, оранжевая). В нормальном ядре при гибридизации видны 2 раздельных зеленых и оранжевых сигнала. При амплификации обнаруживается множество зеленых сигналов (требуется примерно соотношение 1,3 или 1,5 к 1 центромерному сигналу) (см. рис. 60, на вклейке), а при формировании изохромосом с обеих сторон от центромерного оранжевого сигнала выявляются 2 олинаковых (по размеру и форме) зеленых сигнала (см. рис. 61, на вклейке). Использование этой пробы кажется перспективным, однако требуется накопление определенного числа клинических наблюдений с последующим анализом отдаленных результатов лечения этих больных. Следует помнить также о том, что эта проба используется для диагностики врожденной патологии у детей — синдрома Pallister-Killian (тетрасомии хромосомы 12 с формированием изохромосомы 12р).

Спектр исследований геномных нарушений человека с помощью реакции FISH обширен. Можно многое добавить к вышеперечисленным типам исследований, но, к сожалению, это невозможно в пределах небольшого объема данного издания. Кратко следует остановиться на таком исследовании, как идентификация половых хромосом. В онкологии диагностика пола необходима не только для характеристики пограничных состояний у больных с герминогенными новообразованиями гонад. В последнее время появилась проба на участок SRY (sex determining region) на Y-хромосоме (см. рис. 62, на вклейке). Этот участок содержит ген, кодирующий материал, отвечающий за развитие мужского организма. В нашей лаборатории получены первые, но весьма перспективные результаты по анализу тех новообразований полового тяжа, в которых сте-

пень и направленность дифференцировки опухолевых клеток на уровне световой микроскопии неясны. Во многих случаях удалось отдифференцировать гранулезоклеточную опухоль от незрелой сертолиомы.

Кроме того, был выявлен интересный феномен при изучении вирилизирующих опухолей яичников и феминизирующих опухолей яичек. Выяснилось, что участок SRY отсутствует в опухолях первого типа у женщин и сохраняется в новообразованиях второго типа у мужчин (см. рис. 63, на вклейке). Этот феномен требует дальнейшего изучения, поскольку традиционно считалось, что, например, вирилизирующие опухоли яичников возникают из элементов сети яичника — остатков эмбриональной мужской гонады.

Весьма перспективным может быть использование пробы на ген рецептора андрогенов, особенно при анализе клеток рака предстательной железы (см. рис. 64, на вклейке). По нашим, а также данным литературы, в процессе лечения рака предстательной железы антиандрогенами происходит компенсаторная амплификация гена рецептора андрогенов (см. рис. 65, на вклейке). Таких больных, по данным литературы, нецелесообразно в дальнейшем лечить антиандрогенами, поскольку это не только неэффективно, но и порой может привести к прогрессированию процесса.

Установление пола с помощью FISH-реакции очень важно в онкологии для выявления мозаицизма половых хромосом, особенно при решении вопроса о сохранении противоположной гонады при операциях по поводу герминогенных опухолей яичников, в эндокринологической гинекологии при изучении причин преждевременного угасания функции яичников (см. рис. 66, на вклейке).

Пробы на половые хромосомы можно использовать и для точной характеристики клона трансплантированных клеток костного мозга (при разнополом доноре и реципиенте). Кроме того, имеются первые данные о том, что малигнизация гепатоцита сопровождается появлением трисомии по X-хромосоме. Для окончательной проверки данного положения необходимо тщательно дополнительно изучить особенности набора X-хромосом в гиперпластических узелках печени для исключения ложноположительных результатов при анализе пунктата печеночной ткани.

Существует множество проб для идентификации половых хромосом в разных наборах — для тканей, амниотической жидкости, крови и т. д.

#### **III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Кроме традиционных, уже описанных нами методик FISHреакции, как в исследовательскую, так и в диагностическую жизнь внедряются и уже внедрены новые специальные методические наработки и целые направления по изучению и диагностике геномных нарушений. Из этих направлений отметим следующие:

1. Сравнительная геномная гибридизация (Comparative genomic hybridization). Этот метод позволяет провести своего рода скрининг всего генома без предварительного знания, в каких участках могут быть нарушения. Огромным достоинством метода является отсутствие необходимости получения метафазных хромосом исследуемой ткани и клеток. Достаточно иметь ДНК исследуемого материала.

Для проведения сравнительной геномной гибридизации получают ДНК из клеток определенной ткани и метят любым флюоресцентным красителем. Параллельно проводят мечение флюорохромом другого цвета нормальной ДНК. Многие предпочитают для этой цели брать ДНК из клеток крови того же больного. Отдельно следует приготовить метафазные пластинки с нормальными хромосомами, а затем обе ДНК гибридизировать на этих хромосомах. Сравнение интенсивности сигнала флюоресценции позволяет судить об изменении в геноме исследуемой ДНК (см. рис. 67, на вклейке). Обычно метод дает хороший результат, если очаг перестройки генома имеет не меньше 5—10 Мб оснований, и поэтому он чаще применяется для идентификации транслокаций или амплификации. Анализ результатов следует проводить в эпифлюоресцентном микроскопе с обязательным использованием специальной компьютерной программы. Метод очень тонкий, требует тщательно подготовленных хромосомных препаратов без наложения и перекрытия хромосомами друг друга. Логическим продолжением принципа сравнительной геномной гибридизации явилась разработка метода микрочипов, в которых вместо хромосом используются последовательности ДНК, иммобилизованные на поверхности жесткого материала, на стеклянных пластинках.

2. Волоконная флюоресцентная in situ гибридизация, постепенно внедряемая в практику. Принцип метода — использование для FISH-реакции хроматина или изолированных нитей хромосом, что позволяет добиться исключительно высокой разрешающей способности метода. Для получения хроматиновых нитей разработаны разные методы лизиса ядер и вытягивания хроматина, например в геле под воздействием электрического поля.

В заключение подчеркнем несколько общих установок, важных для правильного функционирования лаборатории молекулярной патологии.

Во-первых, следует помнить, что изучение геномных нарушений ни в коей мере не исключает необходимости привлечения к диагностическому процессу базисных клинических данных. Совершенно недопустима принятая во многих лабораториях (в том числе и западных) практика сразу приступать к установлению формы и характера флюоресцентных сигналов. Участок для изучения должен всегда выбираться с учетом особенностей морфологической структуры опухоли, оценка полученных результатов — проводиться с учетом клиники, проведенного лечения и др. Во-вторых, следует широко консультироваться с коллегами из ведущих лабораторий мира, тем более что существование Интернета позволяет передавать на большие расстояния изображение без потери качества и получать полезные советы и замечания. Следует пользоваться рядом Интернет-сайтов, гле даются развернутые сведения о строении генов, их функции, нарушениях и т. д. Среди весьма информативных сайтов можно назвать следующие:

http://AtlasgeneticsOncology.org, http://www.abbottmolecular.com/ info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/FISH.html.

# V. ПРОТОКОЛЫ ДЛЯ ОСНОВНЫХ ТИПОВ FISH-РЕАКЦИИ В ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

FISH-реакция на парафиновом срезе 1-й день

Перед началом реакции стекла с парафиновыми срезами необходимо выдержать в термостате при 60°С примерно 1—2 ч.

Оптимальная толщина срезов 4 мкм.

Предварительно поместить 1 M изотиоцианат Na на водяную баню при 80°C.

- 1. Депарафинизировать срезы по обычной методике.
- 2. Высушить срезы при температуре 45—50°С.
- 3. 0,2 н. раствор НС1 20 мин.
- 4. Вода дистиллированная 3 мин.
- 5. 2xSSC 1 мин.
- 6. 1 М изотиоцианат Na при 80°C 30 мин (раствор можно использовать не более 2 раз).
  - 7. Вода дистиллированная 1 мин.

- 8. 2xSSC 2 раза по 5 мин.
- 9. Предварительно приготовить 0,9% раствор NaCl pH 2,0, нагреть до 37°C. Добавить протеазу до конечной концентрации 0,12 мг/мл. Поставить стекла в приготовленный раствор на 1,15 ч.
  - 10. 2xSSC 2 раза по 5 мин.
  - 11. Высушить срезы при температуре 45—50°С.
- 12. Нейтральный формалин 4% (на 200 мл: 20 мл 40% формалина + 2xSSC 180 мл) на 10 мин.
  - 13. 2xSSC 2 раза по 5 мин.
  - 14. Высушить срезы при температуре 45—50°С.
- 15. 70% формамидДxБ3C 73°C на 5 мин (49 мл формамида + 7 мл 20xSSC + 14 мл дистиллированной воды). Раствор использовать не более чем для 20 стекол.
  - 16. Спирты 70%, 85%, 96% по 2 мин.
  - 17. Высушить срезы при температуре 45—50°С.
- 18. Приготовить пробу по прописи фирмы-изготовителя, после чего центрифугировать и перемешать на вортексе.
- 19. Нанести пробу на стекло, положить на него предварительно вымытое покровное стекло, удалить пузыри и гибридизировать 8 мин при 78°C.
- 20. Заклеить края покровного стекла резиновым клеем и поместить стекла во влажной камере в термостат на 37°С на ночь (16—20 ч). Можно продлить этот период до 44 ч, что приводит к повышению интенсивности сигнала, однако надо при этом обеспечить необходимую влажность камеры, чтобы избежать высыхания воздуха.

#### 2-й день

# Все манипуляции проводить в затемненной комнате

- 1. Снять клей. Часто покровное стекло удаляется вместе с клеем, но если этого не произошло, то опустить предметное стекло в 2xSSC, немного прополоскать и аккуратно удалить покровное стекло.
  - 2. Подержать стекла 2 мин на 73°C в 0,4xSSC/0,3% NP-40.

На 100 мл: 2xSSC - 20 мл,

Н<sub>2</sub>0 - 80 мл,

NP-40 - 300 мкл.

3. Подержать стекла 2 мин в 2xSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре.

На 100 мл: 2xSSC — 100 мл,

NP-40 - 100 мкл.

- 4. Высушить стекла.
- 5. Развести DAPI (28 мкл антифейда + 4 мкл DAPI), если это необходимо. Чаще используют раствор DAPI, уже смешанный с антифейдом.
- 6. Нанести 7 мкл DAPI под большое покровное стекло (15 х 15 мм), 3 мкл на малое покровное стекло (диаметр 10 мм).

Протокол для мазков крови, отпечатков, ядер, выделенных из парафиновых блоков, и клеток осадка мочи

#### 1-й день

- 1. Стекло поместить в 4% параформальдегид на 10 мин при 4°C фиксация (если используется материал, заранее уже фиксированный, этот пункт можно пропустить).
  - 2. 2 смены PBSxl по 5 мин при комнатной температуре.
- 3. Приготовить 0,01 н. раствор HC1, нагреть до 37°C, добавить в раствор протеазу до конечной концентрации 0,06 мг/мл. Поставить стекла в приготовленный раствор на 5 мин.
  - 4. 2 смены PBSxl по 5 мин при комнатной температуре.
  - 5. Охлажденные спирты 70%, 85%, 96% по 2 мин.
  - 6. Стекла высушить при комнатной температуре.
- 7. Приготовить пробу по прописи фирмы-изготовителя, центрифугировать, перемешать на вортексе.
- 8. Нанести пробу (3 мкл) на стекло, положить предварительно вымытое покровное стекло, удалить пузыри, денатурировать при  $78^{\circ}$ С в течение 8 мин.
- 9. Залить резиновым клеем и поместить во влажной камере в термостат на 37°C на ночь.

#### 2-й день

# Все манипуляции проводить в затемненной комнате

- 1. Снять клей. Часто покровное стекло удаляется вместе с клеем, но если этого не произошло, то опустить предметное стекло в 2xSSC, немного прополоскать и аккуратно удалить покровное стекло.
  - 2. Подержать стекла 2 мин на 73°C в 0,4xSSC/0,3% NP-40.

На 100 мл: 2xSSC - 20 мл,

 $H_00$  - 80 мл.

NP-40 - 300 мкл.

3. Подержать стекла 2 мин в 2xSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре.

На 100 мл: 2xSSC - 100 мл,

NP-40 - 100 мкл.

- 4. Высушить стекла.
- 5. Развести DAPI (28 мкл антифейда + 4 мкл DAPI), если это необходимо. Чаще используют раствор DAPI, уже смешанный с антифейдом.
- 6. Нанести 7 мкл DAPI под большое покровное стекло (15 х 15 мм), 3 мкл на малое покровное стекло (диаметр 10 мм).

# Выделение ядер из мочи для FISH-реакции

- **1.** Мочу или промывные воды центрифугировать в пробирках емкостью 15 мл 10 мин при 1200 об/мин.
  - 2. Аккуратно отобрать супернатант.
- 3. Клеточный осадок перенести в эппендорф емкостью 1,5 мл, ресуспендировать в 1 мл предварительно нагретого до 37°C гипотонического раствора (0,56%) КС1.
  - 4. Оставить при комнатной температуре на 20 мин.
  - 5. Центрифугировать 10 мин при 1000 об/мин.
- 6. К клеточному осадку добавить свежеприготовленный фиксатор Карнуа (метанол—уксусная кислота 3:1).
  - 7. Центрифугировать 10 мин при 1200 об/мин.
  - 8. Пункты 6 и 7 повторить еще 1 раз.
  - 9. Центрифугировать 10 мин при 1200 об/мин.
- 10. Полученный клеточный осадок ресуспендировать в небольшом количестве фиксатора.
  - 11. Хранить при —70°C.

# Приготовление препаратов из пунктатов костного мозга

# Среда для костного мозга

В центрифужную пробирку объемом 10—15 мл внести 4,5 мл среды RPMI-1640 с антибиотиком (например, с гентамицином), 0,5 мл гепарина (5000 ЕД) и направить в клинику, где клиницист добавит 0,5—1 мл пунктата костного мозга.

- 1. Перенести материал из пробирки в эппендорф и инкубировать в термостате при 37°C в течение 1,5 ч.
  - 2. Центрифугировать при 1000 об/мин в течение 10 мин.
  - 3. Пипеткой отобрать надосадочную жидкость.
- 4. К осадку добавить предварительно нагретый до 37°C гипотонический раствор (0,56% КС1) до 1,5 мл.

- 5. Осадок осторожно ресуспендировать и инкубировать в термостате при 37°C в течение 25—30 мин.
  - 6. Центрифугировать при 1000 об/мин в течение 10 мин.
  - 7. Пипеткой отобрать надосадочную жидкость.
- 8. Приготовить свежий раствор фиксатора Карнуа 3 части метанола (15 мл):1 часть уксусной кислоты (5 мл).
- 9. К осадку добавить фиксатор 1:1 (-500 мкл), осторожно ресуспендировать и оставить на 5 мин при комнатной температуре.
  - 10. Центрифугировать при 1000 об/мин в течение 10 мин.
  - 11. Пипеткой отобрать надосадочную жидкость.
- 12. К осадку добавить фиксатор 1:1 (-500 мкл), осторожно ресуспендировать и оставить на 15—20 мин при комнатной температуре.
  - 13. Центрифугировать при 1000 об/мин в течение 10 мин.
  - 14. Пипеткой отобрать надосадочную жидкость.
- 15. Пункты с 13 по 15 повторить до появления светло-коричневых мельчайших частиц (суспензии клеток) в среднем 3—5 раз.
- 16. К осадку добавить фиксатор, подбирая объем опытным путем (2—3 капли).

# FISH-реакция с ядрами, выделенными из костного мозга

#### 1-й день

Фиксатор метанол:уксусная кислота 3:1

- 1. Клетки (~50 мкл) нанести на стекло, объем подобрать опытным путем для достижения оптимальной плотности на стеклах, затем прополоскать фиксатором.
- 2. Под микроскопом отметить область с наибольшим количеством клеток.
- 3. Стекло поместить в термостат на 37°C в растворе 2xSSC на 1 ч.
  - 4. Охлажденные спирты 70%, 85%, 100% по 2 мин.
  - 5. Высушить стекла в вертикальном положении.
- 6. Поместить в 70% формамид/2x85С 73°С на 5 мин (49 мл формамида + 7 мл 20xSSC + 14 мл дистиллированной воды). Раствор использовать не более чем для 20 стекол.
  - 7. Охлажденные спирты 70%, 85%, 100% по 2 мин.
  - 8. Высушить стекла на 45°С.
- 9. Приготовить пробу по прописи фирмы-изготовителя, затем центрифугировать и перемешать на вортексе.
  - 10. Нанести 3 мкл пробы на стекло.

- 11. Положить предварительно вымытое покровное стекло диаметром 10 мм, денатурировать при 73°C в течение 8 мин и залить резиновым клеем.
- 12. Стекла поместить во влажной камере в термостат на 37°C на ночь.

#### 2-й день

- 1. Снять клей и покровное стекло.
- 2. Подержать стекла 2 мин на 73°C в 0,4xSSC/0,3% NP-40.

Ha 100 мл: 2хSSC — 20 мл,

 $H_{2}0 - 80$  мл.

NP-40 - 300 мкл.

3. Подержать стекла 2 мин в 2xSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре.

На 100 мл: 2xSSC - 100 мл.

NP-40 - 100 мкл.

- 4. Высушить стекла, вытереть с обратной стороны.
- 5. Развести DAPI (28 мкл антифейда + 4 мкл DAPI).
- 6. Нанести 7 мкл DAPI под большое покровное стекло, 3 мкл под малое покровное стекло. Накрыть покровным стеклом.

# Выделение ядер из парафинового блока

- 1. Нужную область парафинового блока измельчить и поместить в пробирку емкостью 1,5 мл. Депарафинировать в ксилоле (100 мкл) при комнатной температуре 3 раза по 10 мин. Затем выполнить проводку в 100 мкл 96%, 75%, 50% этанола по 2 мин в каждом. После депарафинизации ткань дезагрегировать наконечником. Остатки этанола удалить фитильком из фильтровальной бумаги.
- 2. Ферментативную обработку провести в 100 мкл свежеприготовленного раствора протеиназы К (0,005% протеиназа К в 0,05 М трис-HCl в буфере рН 7,0, 0,01 М ЭДТА, 0,01 М NaCl) при 37°C 30 мин. В течение инкубации с ферментом образец перемешивать на вортексе 3 с каждые 5 мин. Время обработки можно увеличить до появления опалесценции, свидетельствующей о нарастании числа клеток в растворе.
- 3. Отбирать из пробирки жидкую фазу с ядрами, не захватывая хлопья непереваренной ткани, в новую пробирку и центрифугировать при 6000 об/мин 10 мин.
- 4. Аккуратно удалить супернатант с протеиназой K, к ядрам добавить 100 мкл lxPBS (фосфатно-солевой буфер), ресуспен-

- дировать на вортексе и центрифугировать при 6000 об/мин 10 мин.
- 5. После центрифугирования удалить супернатант и к ядерному осадку добавить свежеприготовленный фиксатор (3 части метанола: 1 часть уксусной кислоты), ядра ресуспендировать на вортексе в двух сменах фиксатора.
- 6. Суспензию с фиксированными ядрами хранить при —70°C для FISH.

### Использование скороварки и гибридизация на водяной бане

Это очень простой и доступный метод. С его помощью можно обрабатывать срезы как на заряженных, так и на незаряженных стеклах, хотя первый вид стекол предпочтительнее, поскольку не сопряжен с отслоением срезов.

- 1. Подготовить тканевые срезы, депарафинизировать и регидратировать.
- 2. После этого тканевые срезы (4—6 мкм) перенести на предметные стекла и высушивать в течение ночи при температуре 37°C или 3 ч при температуре 72°C.
- 3. Срезы депарафинировать в ксилоле 2 раза по 10 мин, промыть 2 мин в абсолютном спирте и регидратировать в спиртах нисходящей концентрации абсолютный, 85%, 70% по 2 мин.
- 4. Срезы перенести в дистиллированную воду и держать там до начала процедуры.
- 5. Смешать 1 л дистиллированной воды и 2 мл 0,5 М ЭДТА рН 8,0 в домашней скороварке и нагреть на максимальной мощности скороварки.
- 6. Когда точка кипения достигнута, срезы перенести на металлическую решетку и погрузить в раствор. Крышку закрыть.
- 7. Когда достигается рабочее давление (клапан давления поднимается), еще 2 мин и 40 с продолжать нагревание.
- 8. Весь прибор перенести в раковину и погрузить в холодную воду на 20 с. Клапан давления открыть и крышку снять.
- 9. Медленно добавить водопроводную воду в раствор ЭДТА для охлаждения срезов и их безопасного изъятия, но так, чтобы сама вода непосредственно на срезы не попадала.
- 10. Когда кастрюля наполнится, срезы перенести на 2 мин в стакан с дистиллированной водой.
  - 11. Переваривание протеазой и фиксация срезов.
- 12. Из стокового раствора протеазы (100 мг/мл) приготовить рабочий раствор 0.12 мг на 1 мл в 0.9% растворе NaCl pH

- 2,0 и нагреть на водяной бане до 37°C. Срезы поместить в этот раствор на 30 мин.
- 13. Промыть срезы в 100 мл дистиллированной воды 1 мин, прежде чем перенести их на 2 мин в 100 мл 1% параформальдегида в PBS, который хранился при  $4^{\circ}$ С (этот пункт необязателен, если срезы прикреплены к заряженным стеклам).
- 14. Срезы промыть 1 мин в дистиллированной воде, дегидратировать в серии спиртов по 2 мин в каждом (70%, 85% и абсолютный спирт) и высушить на воздухе при комнатной температуре. Этот этап можно ускорить, используя электрический фен.

# Нанесение FISH-пробы и гибридизация

- 1. Пробы в количестве 1,5 мкл нанести на интересующее место на сухом срезе.
- 2. Срез накрыть покровным стеклом и запечатать жидким резиновым клеем. Можно пользоваться покровными стеклами разной величины от 22 х 22 мм до 6 мм в диаметре в зависимости от размера участка, предназначенного для анализа. Учитывая стоимость проб, можно использовать стекла минимального размера, покрывающие только тот участок, который предположительно содержит изучаемые клетки.
- 3. Когда жидкий клей высохнет, срезы положить внутрь ящика автоклава вместе с увлажненной бумажной салфеткой.
- 4. Ящик закрыть и перенести на водяную баню на 8 мин, предварительно подогретую до 80°С.
- 5. После этого ящик поместить в инкубатор на 37°С и оставить минимум на 16 ч с тем, чтобы произошла гибридизация. Длительность периода гибридизации не установлена строго. 16 ч минимальный рекомендуемый период, но можно использовать и более длительный период, что приведет к несколько более сильному сигналу.
- 6. Удалить несвязанную пробу и провести постгибридизационную промывку.
- 7. Приготовить 2 раствора в стаканах Хеллендаля. Один содержит 100 мл промывочного раствора 1 (0,4xSSC) и 0,3% NH-40, другой 100 мл промывочного раствора 2 (2xSSC, 0,1% NP-40). Стакан с раствором 1 поставить на водяную баню и нагреть до  $72^{\circ}$ С (следует контролировать термометром).
- 8. С помощью маленьких щипцов удалить резиновый клей. Снять покровное стекло и предметное стекло быстро перенести в промывочный раствор 1.

- 9. Колбу осторожно встряхнуть рукой 5 с и инкубировать при  $72^{\circ}$ С в течение 2 мин.
- 10. После этого стекла перенести в промывочный раствор 2, встряхивая 5 с, и инкубировать 2 мин перед тем, как перенести в 100 мл 2xSSC, при комнатной температуре. В одной порции промывочного раствора можно отмыть не более 10 стекол. Если нужно отмыть более 10 стекол, следует раствор заново нагреть до 72°C.
- 11. Срезы заключить в среду, содержащую антифейд и DAPI. Можно срезы сначала окрасить в растворе DAPI, а потом заключить в антифейд.

# ЛИТЕРАТУРА

- 1. *Andreeff M.*, *Pinkel D.* Introduction to Fluorescence in Situ Hybridization: Principles and Clinical Applications. 2001. Vol. P.
- 2. Beaty B., Mai S., Squire J. FISH A Practical Approach. New York, 2002.
- 3. Wolff D. J., Bagg A., Cooky L. D. et al. // J. Mol. Diagn. 2007. Vol. 9, N 2. P. 134-143.