

## Корректное использование ДНК-зондов Kreatech для выявления амплификации гена *MYC* в медуллобластомах методом флуоресцентной гибридизации *in situ*

© М.В. РЫЖОВА<sup>1</sup>, Г.П. СНИГИРЕВА<sup>2</sup>, А.В. ГОЛАНОВ<sup>1</sup>, О.Г. ЖЕЛУДКОВА<sup>2</sup>, Ю.Ю. ТРУНИН<sup>1</sup>, Н.А. АНТИПИНА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России, Москва, Россия

Амплификации онкогенов в большинстве случаев являются прогностическими и предиктивными маркерами различных опухолей, поэтому ДНК-зонды, при использовании которых не выявляются изменения копийности, не должны применяться для диагностики злокачественных опухолей.

**Цель исследования** — сравнительно-сопоставительный анализ ДНК-зондов различных производителей для выявления амплификации гена *MYC* в рутинной практике.

**Материал и методы.** Материалом послужили фиксированные в формалине и залитые в парафиновые блоки фрагменты медуллобластом от 4 пациентов с расхождением результатов при выявлении амплификации гена *MYC*.

**Результаты.** Амплификация гена *MYC* определена при помощи ДНК-зондов Kreatech *MYC* (8q24) / SE 8, Vysis LSI *MYC* SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG и Zytolight SPEC *MYC/CEN* 8 Dual Color Probe. Применение пробы Kreatech TERC(3q26)/*MYC*(8q24)/SE7 Triple-Color не дало возможности выявить амплификацию гена *MYC*, эта проба демонстрировала сбалансированный профиль 8-й хромосомы.

**Выводы.** В рутинной практике методом выбора для исследования копийности гена *MYC* может являться флуоресцентная гибридизация *in situ* с ДНК-зондами Kreatech *MYC* (8q24) / SE 8, Vysis LSI *MYC* SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG и Zytolight SPEC *MYC/CEN* 8 Dual Color Probe. Однако пробу Kreatech TERC(3q26)/*MYC*(8q24)/SE7 Triple-Color мы настоятельно не рекомендуем использовать для данной цели. Кроме того, зонды для флуоресцентной гибридизации *in situ* должны быть обязательно тестированы в крупных референсных лабораториях, занимающихся тем или иным разделом онкопатологии.

*Ключевые слова:* медуллобластома, ген *MYC*, амплификация.

### Информация об авторах:

Рыжова М.В. — д-р мед. наук, <https://orcid.org/0000-0001-7206-6365>, e-mail: [mrizhova@nsi.ru](mailto:mrizhova@nsi.ru);

Снигирева Г.П. — д-р биол. наук, <https://orcid.org/0000-0002-2584-802X>, e-mail: [sni\\_gal@mail.ru](mailto:sni_gal@mail.ru);

Голанов А.В. — д-р мед. наук, проф., <https://orcid.org/0000-0002-0976-4547>, e-mail: [golanov@nsi.ru](mailto:golanov@nsi.ru);

Желудкова О.Г. — д-р мед. наук, проф., <https://orcid.org/0000-0002-8607-3635>; e-mail: [clclud@mail.ru](mailto:clclud@mail.ru);

Трунин Ю.Ю. — канд. мед. наук, e-mail: [ytrunin@nsi.ru](mailto:ytrunin@nsi.ru);

Антипина Н.А. — e-mail: [nantipina@nsi.ru](mailto:nantipina@nsi.ru)

### КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Рыжова М.В., Снигирева Г.П., Голанов А.В., Желудкова О.Г., Трунин Ю.Ю., Антипина Н.А. Корректное использование ДНК-зондов Kreatech для выявления амплификации гена *MYC* в медуллобластомах методом флуоресцентной гибридизации *in situ*. *Архив патологии*. 2019;81(4):66-72. <https://doi.org/10.17116/patol20198104166>

## Correct use of Kreatech DNA probes to detect *MYC* gene amplification in medulloblastomas by fluorescence *in situ* hybridization

© M.V. RYZHOVA<sup>1</sup>, G.P. SNIGIREVA<sup>2</sup>, A.V. GOLANOV<sup>1</sup>, O.G. ZHELUDKOVA<sup>2</sup>, YU.YU. TRUNIN<sup>1</sup>, N.A. ANTIPINA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Acad. N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Russian Research Center of Roentgenology and Radiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

In most cases, oncogene amplification are prognostic and predictive markers for various tumors, therefore DNA probes are unable to reveal changes in the copy numbers should not be used to diagnose malignant tumors.

**Objective** — to comparatively analyze DNA probes from different manufacturers to detect *MYC* gene amplification in routine practice.

**Material and methods.** The study material was formalin-fixed paraffin-embedded medulloblastoma fragments from 4 patients, with discrepancies in the results in the detection of *MYC* gene amplification.

**Results.** *MYC* gene amplification was determined using DNA probes: Kreatech *MYC* (8q24)/SE 8, Vysis LSI *MYC* SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG, and Zytolight SPEC *MYC/CEN* 8 Dual Color Probe. The use of the probes Kreatech TERC (3q26)/*MYC* (8q24)/SE7 Triple-Color probe failed to detect *MYC* gene amplification; this probe showed a balanced profile of chromosome 8.

**Conclusion.** In routine practice, fluorescence *in situ* hybridization with the DNA probes Kreatech *MYC* (8q24)/SE 8, Vysis LSI *MYC*

SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG and Zytolight SPEC MYC/CEN 8 Dual Color Probe can be the method of choice for studying the copy number of the *MYC* gene. However, the authors strongly recommend that the Kreatech TERC (3q26)/MYC (8q24)/SE7 Triple-Color should not be used for this purpose. In addition, probes for fluorescence *in situ* hybridization must be necessarily tested in large reference laboratories dealing with one or another area of oncopathology.

**Keywords:** medulloblastoma, *MYC* gene, amplification.

#### Information about authors:

Ryzhova M.V. — <https://orcid.org/0000-0001-7206-6365>, e-mail: mrizhova@nsi.ru;  
Snigireva G.P. — <https://orcid.org/0000-0002-2584-802X>, e-mail: sni\_gal@mail.ru;  
Golanov A.V. — <https://orcid.org/0000-0002-0976-4547>, e-mail: golanov@nsi.ru;  
Zheludkova O.G. — <https://orcid.org/0000-0002-8607-3635>, e-mail: cledud@mail.ru  
Trunin Yu.Yu. — e-mail: ytrunin@nsi.ru;  
Antipina N.A. — e-mail: nantipina@nsi.ru

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Ryzhova MV, Snigireva GP, Golanov AV, Zheludkova OG, Trunin YuYu, Antipina NA. Correct use of Kreatech DNA probes to detect *MYC* gene amplification in medulloblastomas by fluorescence *in situ* hybridization. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2019;81(4):66-72. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol20198104166>

Флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) является одним из самых простых в применении и интерпретации, экономичных и менее трудозатратных методов исследования хромосомных аномалий в рутинной практике отделений, занимающихся онкопатологией [1–5]. Однако на сегодняшний день все больше патологов и биологов сталкиваются с необходимостью использовать именно те расходные материалы и генетические зонды, которые имеют регистрационное удостоверение на территории Российской Федерации. С сожалением должны констатировать, что наличие регистрационного удостоверения не всегда свидетельствует о том, что данный зонд подходит для изучения количественных изменений генов-кандидатов.

В рутинной практике патолого-анатомического отделения ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России мы неожиданно столкнулись с проблемой, когда оказались не способны обнаружить амплификацию гена *MYC*. Врачи-специалисты, вовлеченные в комплексное лечение медуллобластом у детей, обратили внимание нейропатологов на то, что как минимум у 4 детей с диагнозом медуллобластомы, несмотря на проводимое лечение и диагностированный у них методом FISH сбалансированный профиль 8-й хромосомы (отсутствие амплификации гена *MYC*), характер ответа на лечение и течение заболевания в виде неконтролируемой прогрессии с последующим быстрым летальным исходом соответствовали атипической тератоидно-рабдоидной опухоли либо *MYC*-амплифицированной медуллобластоме.

Мы попросили наших немецких коллег исследовать эти 4 опухоли методом метилирования ДНК на платформе Illumina 850k в Хайделберге (Германия) и повторили метод FISH для выявления возможной амплификации гена *MYC* с зондами Kreatech, Vysis и Zytolight в патолого-анатомическом отделении НМИЦ нейрохирургии и в лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики РНЦРР, при этом с удивлением выявили, что не все ДНК-зонды пригодны для обнаружения амплификации гена *MYC* в медуллобластомах.

## Материал и методы

Для постановки реакции флюоресцентной гибридизации *in situ* использовали фрагменты ткани опухолей медул-

лобластом, фиксированные в формалине и залитые в парафин. С парафиновых блоков подготавливали срезы толщиной 2 мкм, помещали на предметные стекла Polysine Menzel-Gläser и инкубировали ночь в термостате при 45 °С. На одно стекло помещали один образец опухоли.

Далее использовали методику флюоресцентной гибридизации *in situ* с применением стандартных протоколов, прилагающихся к наборам для предварительной обработки Leica (Kreatech) Biosystems Tissue Digestion Kit I и Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit. Использовали следующие пробы: Kreatech MYC (8q24) / SE 8, Kreatech TERC (3q26) / MYC (8q24)/SE 7 Triple-Color, Kreatech MYCN (2P24)/AFF3 (2q11), Vysis LSI MYC SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG, Vysis LSI N-MYC SG/CEP 2 SO, Zytolight SPEC MYC/CEN 8 Dual Color Probe. После нанесения проб предметные стекла накрывали покровными стеклами и обрабатывали клеем Leica (Kreatech) Fixogum Rubber Cement.

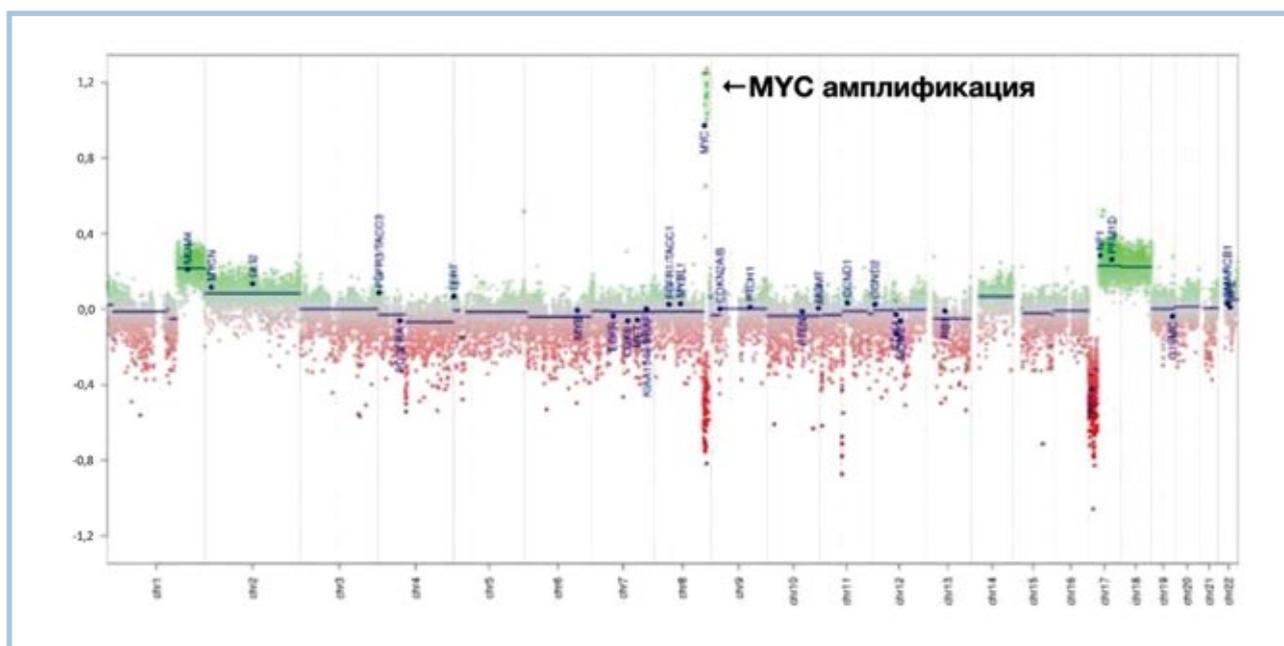
ДНК-зонды Kreatech имеют регистрационное удостоверение на территории РФ. ДНК-зонды Vysis и Zytolight на момент написания статьи не имели регистрационного удостоверения на территории РФ.

Метод FISH проводили с помощью гибридизационных камер ThermoBrite Abbott Molecular и Hybridizer DAKO, денатурацию — при 83 °С в течение 8 мин, гибридизацию — при 37 °С 22 ч. Препараты освобождали от клея, покровных стекол, промывали и заключали под покровное стекло со средой DAPI из набора Leica (Kreatech) Biosystems Tissue Digestion Kit I либо средой Vector Vectashield Mounting medium for fluorescence with DAPI. Готовые препараты хранили в холодильнике при 4 °С. Результаты оценивали спустя как минимум 3 ч на флюоресцентном микроскопе Zeiss Axioskop 40 с помощью фильтров DAPI, FITC и Orange.

## Результаты

Исследование методом Illumina 850k подтвердило диагноз медуллобластомы во всех 4 случаях, у всех пациентов была диагностирована медуллобластома группы 3 с амплификацией гена *MYC* (рис. 1).

Однако мы определили амплификацию гена *MYC* лишь в 3 случаях из 4. Амплификацию гена *MYC* удалось выявить с помощью проб (ДНК-зондов): Kreatech MYC (8q24)/SE



**Рис. 1.** Молекулярный профиль медуллобластомы с амплификацией гена *MYC* (стрелка), полученный на основе исследования методом Illumina 850k.

По оси абсцисс — хромосомы от 1 до 22; по оси ординат — количественные изменения на хромосомах. Зеленым цветом показаны добавки и амплификации, красным цветом — делеции.

**Fig. 1.** The molecular profile of medulloblastoma with *MYC* gene amplification (arrow), which has been obtained with the Illumina 850k array.

*Abscissa:* chromosomes from 1 to 22; *ordinate:* quantitative chromosomal changes. Supplements and amplifications are shown in green, deletions in red.

8, Vysis LSI *MYC* SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG, Vysis LSI N-*MYC* SG/CEP 2 SO и Zytolight SPEC *MYC*/CEN 8 Dual Color Probe, в то время как проба Kreatech TERC (3q26)/*MYC* (8q24)/SE 7 Triple-Color показывала отсутствие амплификации гена *MYC* и сбалансированный профиль 8-й хромосомы (рис. 2).

В оставшемся случае у пациента с медуллобластомой группы 3 и амплификацией гена *MYC* по данным исследования Illumina 850k не выявили амплификацию этого гена с использованием 4 проб, лишь Zytolight SPEC *MYC*/CEN 8 Dual Color Probe показывала добавку гена *MYC* (рис. 3).

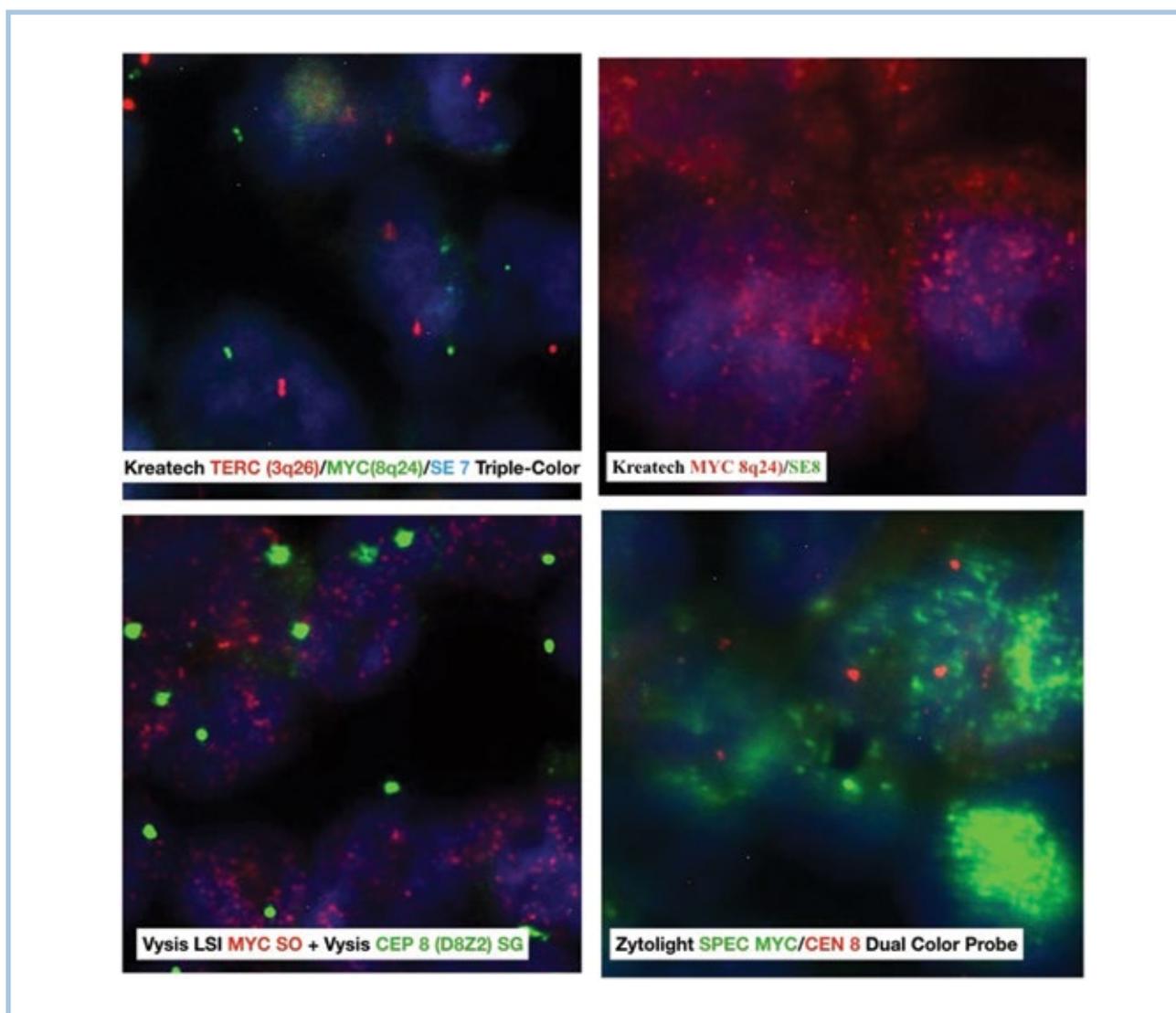
Кроме того, как выяснилось в результате обсуждения и сравнительно-сопоставительного анализа между исследованием медуллобластом методом Illumina 850k и флуоресцентной гибридизации *in situ*, были также пропущены две ампликации гена *MYCN*. Обе имеющиеся у нас в наличии пробы Kreatech *MYCN* (2P24) / *AFF3* (2q11) и Vysis LSI N-*MYC* SG/CEP 2 SO выявили сбалансированный профиль 2-й хромосомы, в то время как Illumina 850k показывала четкую амплификацию гена *MYCN* (рис. 4).

## Обсуждение

Как известно, медуллобластома является злокачественной опухолью, однако на сегодняшний день это курабельное заболевание, у большинства пациентов удается достичь стойкой ремиссии. Лишь одно достаточно редкое генетическое нарушение делает медуллобластому потенциально летальным заболеванием — это амплификация гена *MYC*

[6, 7]. Поэтому нам необходимо в диагностике медуллобластом иметь простой в использовании метод для оценки копийности 8-й хромосомы, несомненно, таким методом является флуоресцентная гибридизация *in situ*. Особую роль играет и качество ДНК-зондов, с чем нам абсолютно неожиданно пришлось столкнуться на практике, что, безусловно, послужило не только печальным, но и поучительным опытом, заставляющим с большей осторожностью относиться к появляющимся в мире ДНК-зондам для диагностики онкопатологии. Лишь сопоставление с данными, полученными при помощи метода Illumina 850k, привело нас к мысли аккуратнее использовать пробы Kreatech. В настоящей работе доказано, что одна из имеющихся регистрационные удостоверение проб Kreatech не должна использоваться для диагностики копийности гена *MYC*, однако мы не сравнивали результаты гибридизации других проб Kreatech с ДНК-зондами других производителей. В настоящий момент ДНК-пробы Kreatech широко применяются для исследования количественных изменений на 1-, 7- и 19-й хромосомах в глиальных опухолях у взрослых и для оценки копийности гена *HER-2* (human epidermal growth factor receptor 2) в метастазирующих в мозг опухолях молочной железы, поскольку от результатов гибридизации напрямую зависит выбор протокола лечения олигодендроглиом, глиобластом и метастазов рака молочной железы.

Следует отметить, что альтернативой флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) для оценки гена *MYC* может служить хромогенная гибридизация *in situ* CISH при наличии в лаборатории иммуноштейнера Ventana, обладающе-



**Рис. 2.** Флюоресцентная гибридизация *in situ* с различными ДНК-зондами к гену *MYC* у одного и того же пациента. С пробой Kreatech TERC(3q26)/MYC(8q24)/SE 7 Triple-Color выявлен сбалансированный профиль, в то время как пробы Kreatech MYC (8q24)/SE 8, Vysis LSI MYC SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG (в красном спектре) и проба Zytolight SPEC MYC/CEN 8 Dual Color Probe (в зеленом спектре) показывают амплификацию гена *MYC*.

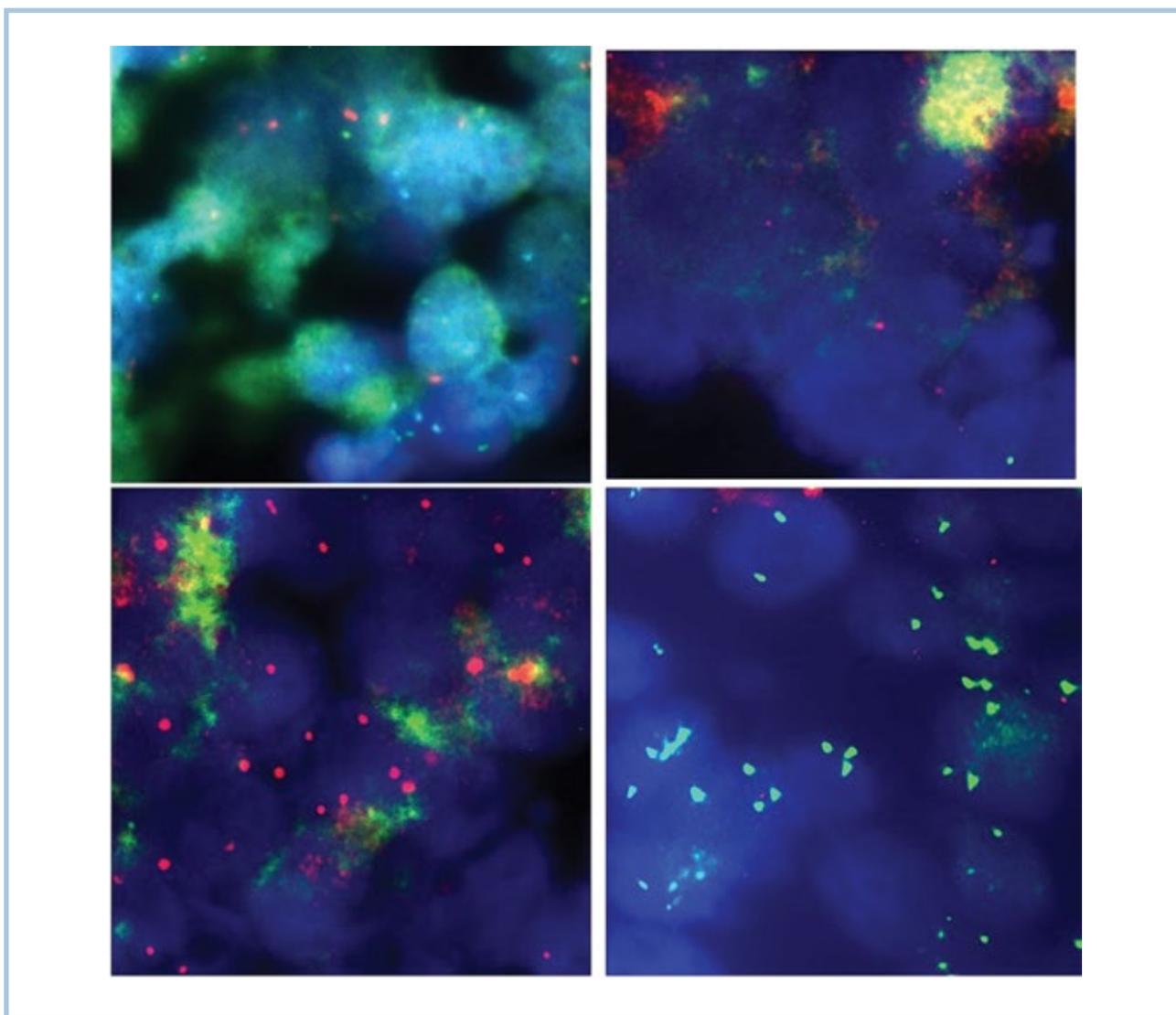
**Fig. 2.** Fluorescence *in situ* hybridization with various DNA probes for the *MYC* gene in the same patient.

The Kreatech TERC (3q26) / MYC (8q24) / SE 7 Triple-Color test reveals a balanced profile, while the Kreatech MYC (8q24)/SE 8, Vysis LSI MYC SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG (in the red spectrum) and Zytolight SPEC MYC/CEN 8 Dual Color Probe (in the green spectrum) tests show *MYC* gene amplification.

го специальной программой и зондом. В своей практике ранее мы использовали методы FISH и CISH, результаты показали четкую корреляцию (рис. 5).

Безусловно, идеальным методом молекулярной диагностики медуллобластом, как собственно и всех других опухолей центральной нервной системы, а также круглоклеточных детских сарком, является оценка структуры метилирования ДНК на уровне всего генома на платформе Illumina 850k [8–10]. Методом Illumina 850k диагностированы те редкие амплификации генов *MYC/MYCN*, которые ни одна из использованных проб не смогла выявить, вероятно, речь идет о некоей особой локализации генов интереса в данных медуллобластомах.

Однако в рутинной практике отделений и лабораторий, вовлеченных в диагностику и исследования генетических нарушений в опухолях, методом выбора для исследования копийности гена *MYC* может являться флюоресцентная гибридизация *in situ* с ДНК-зондами Kreatech MYC (8q24) / SE 8, Vysis LSI MYC SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG и Zytolight SPEC MYC/CEN 8 Dual Color Probe. Однако пробу Kreatech TERC(3q26)/MYC(8q24)/SE7 Triple-Color мы настоятельно не рекомендуем использовать для данной цели, несмотря на наличие регистрационного удостоверения на территории Российской Федерации. Кроме того, нам кажется, что пробы/зонды для флюоресцентной гибридизации *in situ* перед применением в широкой практике и по-



**Рис. 3.** Флюоресцентная гибридизация *in situ* с различными ДНК-зондами к гену *MYC* у пациента с выявленной амплификацией гена *MYC* методом Illumina 850k.

ДНК-зонды Kreatech TERC(3q26)/MYC(8q24)/SE 7 Triple-Color, Kreatech MYC (8q24)/SE 8, Vysis LSI MYC SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG демонстрируют сбалансированный профиль: в то время как проба Zytolight SPEC MYC/CEN 8 Dual Color Probe (в зеленом спектре) показывает небольшую полисомию гена *MYC*.

**Fig. 3.** Fluorescence *in situ* hybridization with various DNA probes for the *MYC* gene in a patient with *MYC* gene amplification detected with the Illumina 850k array.

The DNA probes Kreatech TERC (3q26)/MYC (8q24)/SE 7 Triple-Color, Kreatech MYC (8q24)/SE 8, Vysis LSI MYC SO, Vysis CEP 8 (D8Z2) SG demonstrate a balanced profile, while the Zytolight sample The SPEC MYC / CEN 8 Dual Color Probe test (in the green spectrum) shows slight *MYC* gene polysomy.

лучением регистрационного удостоверения на территории Российской Федерации должны быть обязательно тестированы с использованием позитивных и негативных контролей в крупных референсных лабораториях, занимающихся той или иной онкопатологией.

Исследование проведено в рамках:

— Соглашения о научном сотрудничестве №10 от 18.05.16 между НМИЦ нейрохирургии и РНЦПР;

— НИР РНЦПР, выполняемой согласно государственному заданию Минздрава России, запланированному на 2018—2020 гг. по платформе «Онкология» и по теме 3: Идентификация и оценка клинической значимости молекулярно-генетических маркеров риска возникновения и прогноза злокачественных новообразований и разработка новых методов противоопухолевой терапии на основании перспективных терапевтических мишеней (клеточные технологии, средства генной и пептидной терапии) в разделе «Молеку-

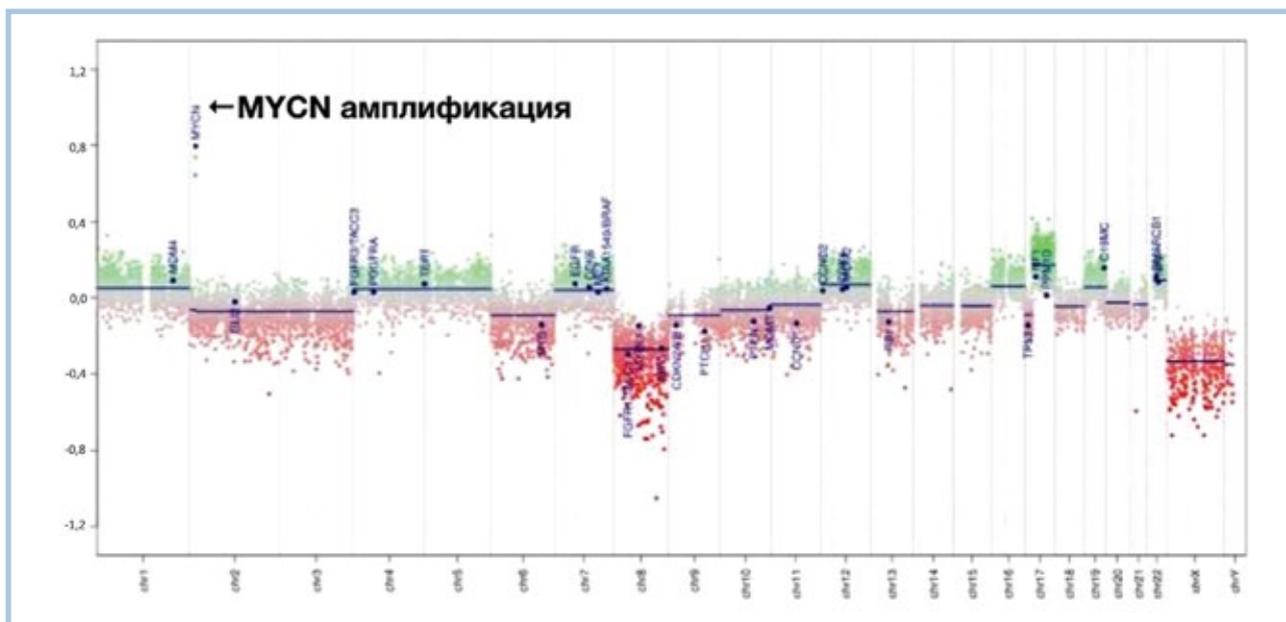


Рис. 4. Молекулярный профиль медуллобластомы с амплификацией гена MYCN (стрелка), полученный на основе исследования методом Illumina 850k.

По оси абсцисс — хромосомы от 1 до 22, а также хромосомы X и Y; по оси ординат — количественные изменения на хромосомах. Зеленым цветом показаны добавки и амплификации, красным цветом — делеции.

Fig. 4. The molecular profile of medulloblastoma with MYC gene amplification (arrow), which has been obtained with the Illumina 850k array.

Abscissa: chromosomes from 1 to 22, as well as chromosomes X and Y; ordinate: quantitative chromosomal changes. Supplements and amplifications are shown in green, deletions in red.

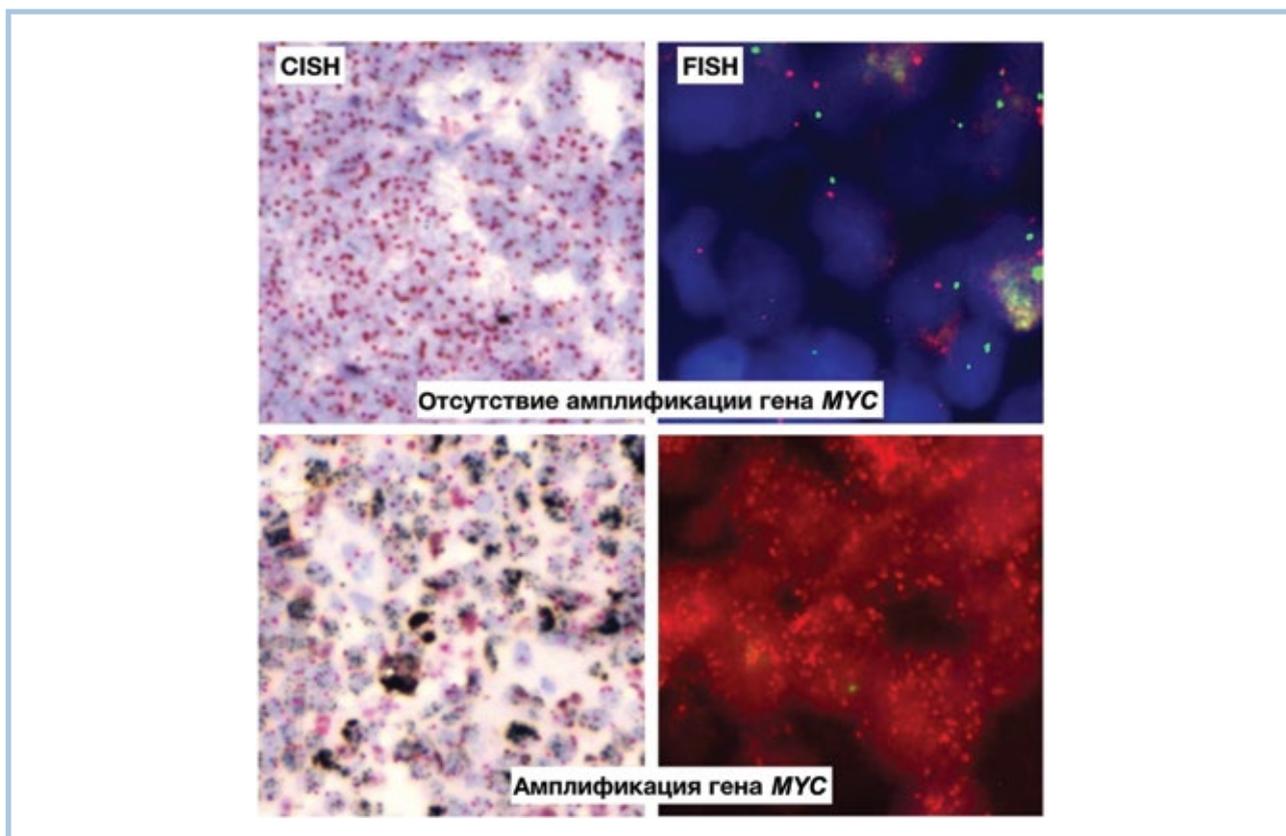


Рис. 5. Сравнение хромогенной и флюоресцентной гибридизации *in situ*.

Fig. 5. Comparison of chromogenic and fluorescence *in situ* hybridization assays.

лярно-генетические факторы прогноза и предиктивные маркеры при злокачественных опухолях головного мозга»;

— Гранта РНФ 18-45-06012 «Индивидуализация стратегии лечения медуллобластом у детей на основании молекулярно-генетического типирования».

*Авторы сердечно благодарят prof. Andrey Korshunov (Heidelberg, Германия) за оказанные неоценимые помощь, дружескую поддержку, ценные советы, а также предоставленную возможность исправить собственные ошибки.*

*Авторы выражают признательность Благотворительному фонду Константина Хабенского за оказанную поддержку при приобретении для проведения флюоресцентной гибридизации *in situ* имеющих высокое качество, но не имеющих регистрационного удостоверения зондов *Vysis*.*

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
The authors declare no conflict of interest.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Van Stedum S, King W. Basic FISH techniques and troubleshooting. *Methods Mol Biol.* 2002;204:51-63.
2. Gu J, Smith JL, Dowling PK. Fluorescence in situ hybridization probe validation for clinical use. *Methods Mol Biol.* 2017;1541:101-118.
3. Tansatit M. Applications of fluorescence in situ hybridization technology in malignancies. *Methods Mol Biol.* 2017;1541:75-90.
4. Tibiletti MG. Interphase FISH as a new tool in tumor pathology. *Cytogenet Genome Res.* 2007;118(2-4):229-236. <https://doi.org/10.1159/000108305>
5. Tibiletti MG. Specificity of interphase fluorescence in situ hybridization for detection of chromosome aberrations in tumor pathology. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;155:143-148. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.03.005>
6. Aldosari N, Bigner SH, Burger PC, Becker L, Kepner JL, Friedman HS, McLendon RE. MYCC and MYCN oncogene amplification in medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections from the Children's Oncology Group. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(5):540-544.
7. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds. *WHO Classification of tumours of the central nervous system.* 4th ed. Lyon: IARC, 2016.
8. Korshunov A, Chavez L, Northcott PA, Sharma T, Ryzhova M, Jones DTW, von Deimling A, Pfister SM, Kool M. DNA-methylation profiling discloses significant advantages over NanoString method for molecular classification of medulloblastoma. *Acta Neuropathol.* 2017;134(6):965-967. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1776-9>
9. Korshunov A, Sahm F, Zheludkova O, Golanov A, Stichel D, Schrimpf D, Ryzhova M, Potapov A, Habel A, Meyer J, Lichter P, Jones DTW, von Deimling A, Pfister SM, Kool M. DNA-methylation profiling is a method of choice for molecular verification of pediatric WNT activated medulloblastomas. *Neuro Oncol.* 2018; Sep25. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy155>
10. Koelsche C, Kriegsmann M, Kommos FKF, Stichel D, Kriegsmann K, Vokuhl C, Grünwald TGP, Romero-Pérez L, Kirchner T, de Alava E, et al. DNA methylation profiling distinguishes Ewing-like sarcoma with EWSR1-NFATc2 fusion from Ewing sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(5):1273-1281. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02895-2>

Поступила 20.02.19

Received 20.02.19