

С.В. КЛИМЕНКО, Ж.А. МІШАРІНА,
І.В. АБРАМЕНКО, Н.І. БІЛОУС, В.Г. БЕБЕШКО
Науковий центр радіаційної медицини АМН України, Київ
E-mail: klymenko_sergiy@yahoo.co.uk

ВИЗНАЧЕННЯ ТРАНСЛОКАЦІЇ BCR/ABL ПРИ РАДІАЦІЙНО-АСОЦІЙОВАНИХ ГОСТРИХ МІЄЛОЇДНИХ ЛЕЙКЕМІЯХ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ IN SITU ГІБРИДИЗАЦІЇ



Повідомляється про результати визначення транслокації BCR/ABL методом флуоресцентної in situ гібридизації в інтерфазних лейкоцитних клітинах у 33 хворих на гостру мієлоїдну лейкемію. Когорта включала 13 пацієнтів, які зазнали дії іонізуючої радіації внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, і 20 пацієнтів із спонтанним захворюванням. Транслокація BCR/ABL, яку визначено в чотирьох та одному випадках відповідно, може відігравати важливу роль в радіаційно-індукованому лейкогенезі.

© С.В. КЛИМЕНКО, Ж.А. МІШАРІНА,
І.В. АБРАМЕНКО, Н.І. БІЛОУС, В.Г. БЕБЕШКО, 2005

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2005. № 6

Вступ. Між цитогенетичними аномаліями та морфологічними варіантами онкогематологічних захворювань існує тісний кореляційний зв'язок. Найбільш розповсюдженими змінами хромосом при гострих мієлоїдних лейкеміях (ГМЛ) є t(8;21) (q22;q22), t(15;17) (q22;q12) та inv(16)(p13q22), які асоціюються відповідно з M2, M3 та M4eо варіантами за Франко-Американо-Британською (ФАБ) класифікацією [1]. Транслокація t(9;22)(q34;q11) є ознакою хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) і призводить до формування філадельфійської (Ph) хромосоми, а на молекулярному рівні — гібридного гена BCR/ABL, який кодує однойменний протеїн із значною тирозинкіназною активністю [2]. При каріотипуванні Ph хромосому знаходять у 95 % хворих на ХМЛ, в переважній більшості решти випадків ознаки утворення гена BCR/ABL визначаються при молекулярних дослідженнях [3]. Транслокація t(9;22) (q34;q11) описана і при гострих лейкеміях. Поширеність аномалії при гострій лімфобластній лейкемії (ГЛЛ) становить 17–25 %, при спонтанних ГМЛ — 1–3 % [4–6].

Deininger et al. [7] в експериментах з клітинними лініями продемонстрували, що іонізуюча радіація (IP) здатна безпосередньо формувати специфічні злиті гени, а саме BCR/ABL, AML1/ETO, і довели імовірність збільшення серед опромінених осіб захворюваності на лейкемії, які асоційовані з цими аномаліями. Деякі гени формувались частіше, ніж інші, що імовірно пояснює, чому захворюваність на різні варіанти лейкемії та солідних пухлин у людини після впливу IP змінюється по-різному.

ГМЛ є гетерогенним захворюванням із широким спектром хромосомних порушень. Метою нашого дослідження було визначення, наскільки важливим є формування химерного гена BCR/ABL при ГМЛ, асоційованих з впливом IP. За допомогою флуоресцентної in situ гібридизації (FISH) з використанням локус-специфічних до генів BCR та ABL проб ми досліджували групу хворих на ГМЛ, які приймали участь у ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на Чорнобильській АЕС (ЧАЕС) або жили на забруднених радіонуклідами територіях України.

Матеріал і методика. Досліджували периферичну кров або кістковий мозок 33 хворих на ГМЛ, яку діагностовано в період з 1997 по

2004 рр. Діагноз базувався на морфологічних, цитохімічних та фенотипових характеристиках субстратних клітин. Статеві-вікові та клінічні дані пацієнтів наведені в таблиці. Основна група містила 6 учасників ЛНА, які були залучені до робіт в зоні ЧАЕС в 1986—1987 рр., та 7 евакуйованих із зони відчуження та жителів забруднених радіонуклідами територій України. Джерелом оцінки приблизного діапазону поглинутих доз ІР для пацієнтів в нашому дослідженні стали опубліковані дані ретроспективної дозиметрії учасників ЛНА і постраждалих від Чорнобильської катастрофи. Середню ефективну дозу від зовнішніх джерел радіації для ліквідаторів 1986—1987 рр. (випадки 1—6) оцінено в 160 мЗв [8], евакуйованих із зони відчуження (випадок 7) — в 15 мЗв [9]. У формуванні доз жителів забруднених територій, окрім зовнішніх джерел, важливу роль відіграють інкорпоровані радіонукліди. Значення ефективних доз від зовнішнього та внутрішнього опромінення для жителів забруднених територій (випадки 8—13) розраховані з використанням даних про дозиметричну ситуацію в місці проживання [10]. Оцінені індивідуальні значення коливались від 1,5 до 31,8 мЗв і становили в середньому 11,9 мЗв. Наведене стало для нас підставою для класифікації пухлинного процесу як радіаційно-асоційованого. Контрольну групу склали 20 хворих без радіаційного анамнезу зі спонтанною ГМЛ.

Мононуклеарні клітини зразків кісткового мозку або периферичної крові, що містили щонайменше 30 % лейкоцитних клітин, ресуспендували в фізіологічному розчині. Після гіпотонічної обробки 0,075 М розчином КСІ клітини фіксували в суміші абсолютного метанолу та льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1, капали на предметне скельце і висушували на повітрі. FISH на інтерфазних ядрах проводили з використанням комерційної проби BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation (Vysis, Downers Grove, США) за інструкціями виробника.

Препарати інкубували з пепсином в концентрації 100 мкг/мл в 0,01 М НСІ протягом 150 с при 37 °С. Далі в глибоких склянках при кімнатній температурі промивали в фосфатно-солевому буфері (ФСБ) і 0,05 М MgCl₂ в ФСБ, фіксували в 1%-ному параформальдегіді в

Результати визначення транслокації BCR/ABL при ГМЛ методом FISH

Пацієнт, №	Стать / вік*, роки	Група	ФАБ варіант	Результат FISH
1	Ч/60	Л	M0	—
2	Ч/67	Л	M0	+**
3	Ч/59	Л	M1	+
4	Ч/54	Л	M1	—
5	Ч/55	Л	M2	+
6	Ч/43	Л	M4	—
7	Ч/50	П	M3	—
8	Ч/33	П	M4	—
9	Ч/29	П	M4	—
10	Ч/45	П	M4	+
11	Ж/68	П	M4	—
12	Ч/57	П	M5a	—
13	Ч/42	П	M5b	—
В групі радіаційно-асоційованих ГМЛ				4/13
14	Ч/57	К	M0	—
15	Ч/27	К	M2	—
16	Ч/25	К	M2	—
17	Ч/49	К	M2	—
18	Ж/59	К	M4	—
19	Ж/61	К	M4	+
20	Ч/48	К	M4	—***
21	Ч/66	К	M4	—
22	Ч/66	К	M4	—
23	Ч/28	К	M4eo	—
24	Ж/64	К	M4eo	—
25	Ч/44	К	M4eo	—
26	Ч/47	К	M4eo	—
27	Ч/26	К	M4eo	—
28	Ч/55	К	M5a	—
29	Ч/40	К	M5a	—
30	Ж/35	К	M5a	—
31	Ж/30	К	M5a	—
32	Ж/25	К	M5a	—
33	Ч/46	К	M6	—
В групі спонтанних ГМЛ				1/20
В цілому				5/33

Примітка. Ч — чоловіча стать; Ж — жіноча стать; Л — учасник ЛНА на ЧАЕС; П — проживаючі на забруднених радіонуклідами територіях та евакуйовані із зони відчуження; К — контроль, хворі на спонтанні ГМЛ. * Вік в момент діагностування захворювання. ** Випадок з двома злитими сигналами BCR/ABL. *** Випадок з утратою одного із локусів ABL. «—» — негативний; «+» — позитивний.

ФСБ, промивали в ФСБ, дегідрували в трьох змінах етанолу — 70, 90, 100 %. Препарати денатурували 4—5 хв при 73 °С в 70%-ному

розчині формаміду в $2\times\text{SSC}$. Після денатурації препарати дегідратували в трьох змінах охолодженого етанолу — 70, 90, 100 %. Гібридизаційну суміш денатували при 73 °C протягом 5 хв, наносили на денатуровані клітини при 45–50 °C, інкубували в вологій камері протягом 16 год при 37 °C. Після інкубації препарати полоскали в $2\times\text{SSC}$ при температурі 42 °C, промивали в 50%-ному розчині формаміду в $2\times\text{SSC}$, в $2\times\text{SSC}$, 0,2 $\times\text{SSC}$, 0,1 % NP 40 в фосфатному буфері, DAPI (4',6'-діамідіно-2-феніліндол) в концентрації 150 нг/мл в $2\times\text{SSC}$. Для перегляду препаратів використовували флуоресцентний мікроскоп Olympus BX 51 з фільтрами для DAPI, FITC, Cy3, ртутною лампою 100 Вт та програмою аналізу зображень Cyto Vision/V. 3.00 build 61 (Applied Imaging Corp., Santa Clara, CA, США). В кожному випадку аналізували від 100 до 500 інтерфазних ядер. Локус-специфічна проба BCR/ABL являє собою суміш пофарбованої флуорохромом Spectrum Green проби до гена BCR (22q11.2) та пофарбованої флуорохромом Spectrum Orange проби до гена ABL (9q34). В нормальних клітинах два оранжевих сигнали відповідають двом копіям ABL, а два зелених — двом копіям BCR. В клітинах з BCR/ABL транслокацією, за одиничними виключеннями, спостерігаються один оранжевий, один зелений та один змішаний жовтий сигнал, який формується внаслідок злиття сигналів оранжевого та зеленого кольору.

Випадок вважали за позитивний щодо порушень в локусах BCR та/або ABL в тому разі, якщо більше за 10 % клітин мали ознаки аномалії. Препарати аналізували незалежно два дослідники і щодо кожного випадку досягнуто консенсус.

Для аналізу розбіжностей в частоті визначення гена BCR/ABL в досліджуваних групах використовували двобічний тест Фішера для таблиць 2×2 в програмі STATISTICA 4.5 (Stat Soft, Tulsa, OK, США).

Результати досліджень та їх обговорення. Результати флуоресцентного цитогенетичного аналізу 33 пацієнтів згруповані в таблиці. Аномальні патерни гібридизації виявлені в 6 випадках. Типові ознаки BCR/ABL транслокації визначено у 4 хворих (№ 3, 5, 10, 19). У пацієнта № 2 95 % клітин демонстрували один оран-

жевий, один зелений та два змішаних жовтих сигнали. Такий патерн спостерігається тоді, коли, крім транслокації t(9;22)(q34;q11), в клітинах існує ще одна, додаткова, Ph хромосома. У пацієнта № 20 в 100 % проаналізованих клітин визначено два зелених і один оранжевий сигнали. Відсутність одного оранжевого сигналу може визначатись при делеції ділянки довгого плеча хромосоми 9, яка включає ген ABL, або при втраті всієї хромосоми 9. В решті випадків виявлено нормальний патерн гібридизації.

В цілому, транслокація BCR/ABL при ГМЛ в нашому дослідженні виявлена з дуже високою частотою і визначена у 5 із 33 пацієнтів. В дослідженні Paietta et al. [5] частота аномалії в групі із 776 хворих на ГМЛ становила 0,9 %. Keung et al. [6] повідомили, що за період із 1993 по 2001 рр. Лабораторією цитогенетики Університету м. Вінстон-Салем (США) в когорті із 545 пацієнтів на ГМЛ верифіковано лише 3 випадки (0,6 %) Ph позитивного захворювання. Дійсно, транслокація BCR/ABL зустрічається з низькою частотою при ГМЛ в Західній Європі та Америці [5, 6, 11]. Однак не виключено, що спонтанний рівень цієї аномалії при ГМЛ в слов'янській популяції значно вищий. Ця гіпотеза ще потребує опрацювання.

Оскільки Ph позитивна ГМЛ є надзвичайною подією, виникає питання, чи не є таке захворювання бластною кризою раніше не діагностованої ХМЛ? Дискусія щодо цього ведеться, але більшість дослідників з огляду на численні повідомлення про молекулярні дослідження Ph позитивної ГМЛ як з M-BCR, так і з m-BCR перебудовами вважають це захворювання існуючим самостійно [6, 12]. Ми провели ретельний аналіз медичної документації всіх пацієнтів, у яких визначено транслокацію BCR/ABL в нашому дослідженні, і виключаємо, що ГМЛ у них діагностовано помилково. Проти діагнозу ХМЛ свідчили коротка тривалість історії хвороби з гострою протягом декількох днів чи тижнів маніфестацією патологічного процесу. До того аналізу крові у хворих не мали істотних змін. У пацієнтів відзначалась тенденція до ініціального гіперлейкоцитозу і інфільтрації периферичної крові бластними клітинами при відсутності базо-

фільно-еозинофільної асоціації, не спостерігалось значного збільшення розмірів печінки та селезінки.

Транслокацію BCR/ABL ми переважно визначили в групі радіаційно-асоційованих ГМЛ. При порівнянні частоти аномалії в цій групі з групою хворих на спонтанні ГМЛ різниця була на межі статистичної значущості (4 із 13 проти 1 із 20, $p = 0,066$). Однак у хворих на ГМЛ — учасників ЛНА на ЧАЕС, які потенційно зазнали найбільш значної дії ІР, транслокація BCR/ABL визначена у 3 із 6 осіб і зустрічалась достовірно частіше, ніж серед пацієнтів контрольної групи (1 із 20, $p < 0,05$).

Хоча ми і визначили, що радіаційно-асоційовані ГМЛ характеризуються транслокацією BCR/ABL непропорційно частіше, ніж спонтанні, вважати цю аномалію за специфічну ознаку індукованого радіацією лейкоемічного процесу було б передчасно. З урахуванням обмеженої кількості пацієнтів в нашій роботі подальші дослідження на більшій когорті є доцільними для підтвердження отриманих результатів. У хворих в обох групах при обстеженні методом FISH переважно не відзначалось перебудов локусів BCR та ABL і, отже, вони були невизначеними за якимись молекулярними ознаками.

Крім того, можливе існування інших, цитогенетичних чи молекулярно-біологічних, факторів, які у доповнення до транслокації BCR/ABL формують повний спектр параметрів, що розмежовують радіаційно-індуковані та спонтанні ГМЛ.

Отримані дані спонукають дещо переглянути існуючу концепцію лікування вторинних ГМЛ. Експресія BCR/ABL є істотним фактором формування медикаментозної резистентності при лейкоемічних процесах. Вона надає пухлинним клітинам незалежність від ростових факторів і порушує процеси реалізації апоптозу [13]. Визначена особливість ГМЛ в учасників ЛНА на ЧАЕС відкриває нові можливості в лікуванні радіаційно-асоційованих лейкоемій. Завдяки інгібітору тирозин кіназної активності STI571 (Imatinib) у 74 % хворих на ХМЛ вдається досягти цитогенетичної ремісії захворювання [14]. Попередні результати використання STI571 при Ph позитивних ГЛЛ є також надзвичайно багатообіцяючими [15]. За

аналогією можна очікувати високу ефективність STI571 і при Ph позитивних ГМЛ. На жаль, клінічні випробування STI571 при Ph позитивних ГМЛ досі не ведуться, а повідомлення про досвід застосування поодинокі. Yamaguchi et al. [16] оприлюднили історію хвороби пацієнта на BCR/ABL позитивну рефрактерну ГМЛ, який завдяки STI571 досяг довготривалої ремісії. Viniou et al. [17] повідомили про високу ефективність препарату в аналогічній клінічній ситуації. Визначення доцільності та доведення ефективності STI571 при BCR/ABL позитивних ГМЛ потребує подальших досліджень та проведення рандомізованих потужних клінічних випробувань.

Висновки. Транслокація BCR/ABL при радіаційно-асоційованих ГМЛ в учасників ЛНА на ЧАЕС частіше, ніж при спонтанних ГМЛ. Дослідження на більшій когорті пацієнтів є доцільними для підтвердження значущості формування транслокації BCR/ABL в радіаційному лейкогенезі. Використання комбінації клінічних, цитологічних, цитогенетичних, молекулярно-біологічних та імунофенотипових досліджень необхідні при проведенні диференційного діагнозу між ГМЛ і ХМЛ в осіб, що зазнали дії ІР внаслідок аварії на ЧАЕС.

SUMMARY. We report the results of BCR/ABL translocation analysis on interphase leukemic cells of 33 acute myeloid leukemia (AML) patients by fluorescence *in situ* hybridization. Of these, there were 13 persons exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl accident with radiation-associated AML and 20 patients with spontaneous disease. BCR/ABL translocation which was detected in 4 and 1 case respectively may play an important role in radiation-induced leukemigenesis.

РЕЗЮМЕ. Сообщается о результатах определения транслокации BCR/ABL методом флуоресцентной *in situ* гибридизации в интерфазных лейкоемических клетках у 33 больных острой миелоидной лейкоемией (ОМЛ). Когорта включала 13 пациентов, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации вследствие аварии на Чернобыльской АЭС, и 20 пациентов со спонтанным заболеванием. Транслокация BCR/ABL, которую выявлено в четырех и одном случаях соответственно, может играть существенную роль в радиационно-индуцированном лейкогенезе.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D.* The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms // *Blood*. — 2002. — **100**. — P. 2292—2302.
2. *Barnes D.J., Melo J.V.* Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukemia // *Acta Haematol.* — 2002. — **108**. — P. 180—202.
3. *Kurzrock R., Bueso-Ramos C.E., Kantarjian H.M., et al.* BCR rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia revisited // *J. Clin. Oncol.* — 2001. — **19**. — P. 2915—2926.
4. *Pui C.H., Relling M.V., Downing J.R.* Acute lymphoblastic leukemia // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — **350**. — P. 1535—1548.
5. *Paietta E., Racevskis J., Bennett J.M., et al.* Biologic heterogeneity in Philadelphia chromosome-positive acute leukemia with myeloid morphology: the Eastern Cooperative Oncology Group experience // *Leukemia*. — 1998. — **12**. — P. 1881—1885.
6. *Keung Y.K., Beatty M., Powell B.L., et al.* Philadelphia chromosome positive myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia-retrospective study and review of literature // *Leuk. Res.* — 2004. — **28**. — P. 579—586.
7. *Deininger M.W.N., Bose S., Gora-Tybor J., et al.* Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation // *Cancer Res.* — 1998. — **58**. — P. 421—425.
8. *Чумак В.В., Шолом С.В.* Облучение ликвидаторов // Медицинские последствия аварии на Чернобыльской атомной станции. Кн. 1. Эпидемиология медицинских последствий аварии на Чернобыльской АЭС / Под ред. В.А. Бузунова, И.А. Лихтарева. — Киев : МЕДЭКОЛ МНИЦ БИО-ЭКОС, 1999. — С. 41—48.
9. *Likhtarev I.A., Chumack V.V., Repin V.S.* Retrospective reconstruction of individual and collective external gamma doses of population evacuated after the Chernobyl accident // *Health Phys.* — 1994. — **66**. — P. 643—652.
10. *Ліхтарев І.А., Ковган Л.М., Берковський В.Б. та ін.* Ретроспективно-прогнозна дози опромінення населення та загально дозиметрична паспортизація 1997 р. населених пунктів України, що зазнали радіоактивного забруднення внаслідок Чорнобильської аварії. Збірка 7. — Київ, 1998. — 155 с.
11. *Hassan R., Otazu I., Ornellas M.H. et al.* A child with Philadelphia positive (ph⁺)-acute leukemia with myeloid morphology: one case of stem cell origin // *Leuk. Lymphoma*. — 2004. — **45**. — P. 1925—1929.
12. *Advani A.S., Pendergast A.M.* Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects // *Leuk. Res.* — 2002. — **26**. — P. 713—720.
13. *Keeshan K., Mills K.I., Cotter T.G., McKenna S.L.* Elevated Bcr-Abl expression levels are sufficient for a haematopoietic cell line to acquire a drug-resistant phenotype // *Leukemia*. — 2001. — **15**. — P. 1823—1833.
14. *Hochhaus A.* Molecular response and resistance to Imatinib // *Hematology J.* — 2003. — **4**. — P. 15—20.
15. *Ottmann O.G., Druker B.J., Sawyers C.L., et al.* A phase II study of imatinib in patients with relapsed and refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemia // *Blood*. — 2002. — **100**. — P. 1965—1971.
16. *Yamaguchi H., Inokuchi K., Yokomizo E. et al.* Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia with tetraploidy // *Int. J. Hematol.* — 2003. — **75**. — P. 63—66.
17. *Viniou N.A., Vassilakopoulos T.P., Giakoumi X. et al.* Ida-FLAG plus imatinib mesylate-induced molecular remission in a patient with chemoresistant Ph1+ acute myeloid leukemia // *Eur. J. Haematol.* — 2004. — **72**. — P. 58—60.

Надійшла 16.03.05