

А.С. Лук'янова
З.В. Масляк
М.О. Вальчук
В.Є. Логінський
Б. Пеньковська-Греля

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України», Львів, Україна

Онкологічний центр —
Інститут ім. М. Складовської-Кюрі, Варшава, Польща

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, діагностика, Ph-хромосома, ген *BCR/ABL*, ген *ASS*.

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ЗМІНИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ ТА ЇХ ВИЯВЛЕННЯ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ *IN SITU* ГІБРИДИЗАЦІЇ (FISH)

Резюме. Дослідження проведено у 52 пацієнтів із підозрою на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) для виявлення химерного гена *BCR/ABL* та оцінки частоти і діагностичного значення різних типів гібридизації. Ген *BCR/ABL* виявлено у 85% пацієнтів, з типовою гібридизацією у 52% випадків та атиповою — у 48% випадків. Атипова гібридизація була наслідком додаткових фузійних сигналів у 21% зразків, варіантних транслокацій — у 11%, делецій гена *ABL* — у 7%, делецій гена *ABL/BCR* — у 5%, вставки гена *BCR* в ген *ABL* — у 2% і варіантної транслокації з одночасною делецією гена *ABL/BCR* — у 2%.

ВСТУП

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) стала першим онкогематологічним захворюванням, при якому була описана специфічна хромосомна аномалія. Утворення характерного цитогенетичного маркера — філадельфійської (Ph) хромосоми — є основною патогенетичною подією у виникненні цієї хвороби. Наявність такої перебудови є підставою для диференційної діагностики між ХМЛ та іншими мієлопроліферативними процесами з подібними клініко-гематологічними проявами, до яких належать мієлофіброз, есенціальна тромбоцитемія, гіперезинофільний синдром, хронічна мієломоніцитарна лейкемія, лейкемоїдні реакції. Ph утворюється внаслідок реципрокної транслокації $t(9;22)(q34;q11)$. Результатом транслокації є утворення химерного гена *BCR/ABL*, продукт якого — протеїн p210 — має підвищену тирозинкіназну активність і призводить до неконтрольованої проліферації клітин мієлоїдного ряду. Приблизно у 5–10% пацієнтів виявляють варіантні і так звані замасковані транслокації, які дуже складно (а подекуди і неможливо) ідентифікувати за допомогою класичного цитогенетичного дослідження. Сучасні стандарти діагностики ХМЛ потребують рутинного застосування методу флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH), який не тільки ідентифікує ген *BCR/ABL*, але й дозволяє отримати багато важливої додаткової інформації. Якщо картина гібридизації показує наявність *BCR/ABL*, але відрізняється від типової, це свідчить про додаткові зміни в ділянці злиття генів або про комплексну транслокацію з участю генів *BCR* та *ABL*. Ефективним методом вивчення таких додаткових змін є аналіз статусу гена *ASS* (argininosuccinate synthetase), локалізованого проксимально до гена *ABL* на хромосомі 9. На сьогодні в Україні цей метод, на жаль, ще не набув поширення, насамперед, у зв'язку з його високою вартістю.

Мета роботи — дослідження спектра хромосомних порушень, що виявляються методом FISH, у пацієнтів з ХМЛ і з'ясування їх діагностичного значення.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено у 52 хворих, які перебували на обстеженні та лікуванні у базовому гематологічному відділенні, консультативній поліклініці та відділенні гематології ДУ ІПКТМ АМНУ протягом 2003–2007 рр. Обстежена група налічувала 29 жінок і 23 чоловіків, медіана віку на момент встановлення діагнозу становила 40 років (від 6 до 82). Серед хворих, у яких встановлено діагноз ХМЛ, у хронічній фазі перебували 29, у фазі акселерації — 13 і в бластній кризі — 2 особи. Переважна більшість (45 хворих) на момент проведення обстеження були попередньо проліковані цитостатичними препаратами або препаратами цільової дії (препаратами інтерферону α -2 та інгібітором тирозинкінази імаїнібом мезилатом-3) від декількох тижнів до 10 і більше років; лише 6 пацієнтів не отримували лікування.

Цитогенетичне дослідження було одноразово проведено у 46 осіб, повторно — у 6. Дослідження FISH проводили у всіх пацієнтів з метою верифікації діагнозу та визначення характеру гібридизації у *BCR/ABL*-позитивних пацієнтів.

Кістковий мозок, отриманий шляхом стерильної пункції, культивували *in vitro* протягом 24–48 год без додавання стимуляторів. Культивування клітин та фіксацію культури проводили за стандартною методикою [1, 2]. Суспензія зафіксованих клітин була матеріалом для цитогенетичних та молекулярно-цитогенетичних досліджень. Приготування препаратів метафазних хромосом та GTG-фарбування проводили згідно з Н.С. Wang, S. Fedoroff [3]. Хромосомний аналіз здійснювали на мікроскопах «Olympus BX41» та «Axioplan Zeiss» при збільшенні $\times 1000$ за допомогою програми MetaSystems. Аналізували 20–25 метафаз у кожному випадку. Каріотипування проводили згідно з критеріями ISCN 2005 [4].

Молекулярно-цитогенетичний аналіз проводили методом флуоресцентної *in situ* гібридизації

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

(FISH) на інтерфазних ядрах та метафазних пластинках в лабораторії цитогенетики Онкологічного центру — Інституту ім. М. Складовської-Кюрі (Польща). У роботі використовували мітки: LSI BCR/ABL Dual Colour Dual Fusion Probe та LSI 9q34ASS (Vysis, США). Підготовку препаратів та процедуру гібридизації здійснювали за D. Pinkel та співавторами [5] з урахуванням рекомендацій виробника мітки. Аналіз препаратів проводили за допомогою мікроскопа «Ахіоплан Zeiss» з відповідним набором фільтрів у програмі Lucia (Республіка Чехія) з підрахунком мінімум 200 інтерфазних ядер. Ефект гібридизації з міткою BCR/ABL у типовій клітині з цією аномалією проявляється у вигляді двох колокалізаційних сигналів жовтого кольору (2Y), які знаходяться на похідних хромосом 9 і 22, одного червоного сигналу (1R), який знаходиться на нормальній хромосомі 9, і одного зеленого сигналу (1G), який знаходиться на нормальній хромосомі 22. Таким чином, картина гібридизації при типовій $t(9;22)(q34;q11)$ позначається як 2Y1R1G. Гібридизація з міткою ASS в нормальних клітинах показує наявність двох блакитних сигналів (2Aq). Втрата одного із сигналів вказує на делецію однієї з копій гена ASS.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У 52 пацієнтів проведено комплексне цитогенетичне дослідження, до якого входили аналіз каріотипу та FISH для виявлення химерного гена *BCR/ABL* (табл. 1). Дослідження каріотипу було успішним у 36 (69%) випадках, у 16 (31%) — отримати метафазні пластинки не вдалось. У групі хворих, у яких було одержано результат каріотипу, Ph-хромосому виявили у 30 випадках і у 6 — нормальний каріотип. При дослідженні зразків методом інтерфазної FISH сигнал, характерний для химерного гена *BCR/ABL*, виявлено у 44 із 52 (85%) хворих (див. табл. 1А, В, С), у 8 випадках він був відсутнім (15%) (див. табл. 1D). У неліквованих хворих (5 випадків) частка клітин із фузійним геном *BCR/ABL* становила 82–100%, у тих, які отримували лікування, — від 30 до 100%. У групі *BCR/ABL*-позитивних пацієнтів спостерігали як типовий, так і нетипові зразки гібридизації. Типову картину 2Y1R1G виявлено у 23 (52%) хворих, що відповідає класичній транслокації $t(9;22)(q34;q11)$ і збігається з результатами дослідження каріотипу у всіх випадках, де отримано метафазні пластинки (див. табл. 1А, рис. 1).

Група *BCR/ABL*-позитивних хворих із нетиповими зразками гібридизації налічувала 21 (48%) випадок. З метою уточнення природи походження нетипових сигналів проводили FISH на метафазних пластинках і зіставляли отримані результати з результатами каріотипування. Серед нетипових зразків найчисленнішу групу (21%) становили такі із збільшеною кількістю фузійних сигналів (див. табл. 1В).

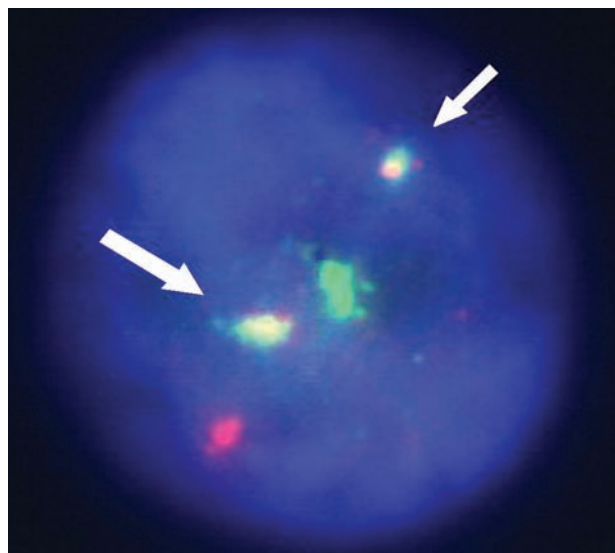


Рис. 1. Картина гібридизації при наявності в клітині Ph-хромосоми: 2Y1R1G

У 8 випадках виявлено один додатковий фузійний сигнал, який супроводжувався типовим розташуванням сигналів на незмінених генах *ABL* (R) і *BCR* (G), результатом чого була гібридизація 3Y1R1G (рис. 2).

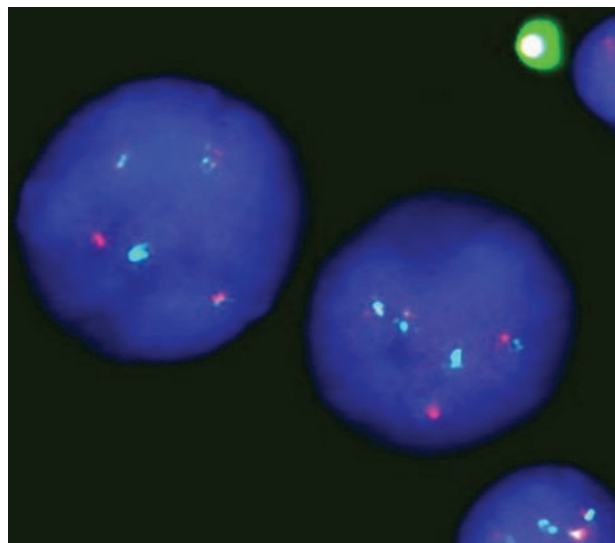


Рис. 2. Картина гібридизації при наявності в клітині двох копій Ph-хромосоми: 3Y1R1G

Така картина свідчить про наявність у клітині класичної $t(9;22)$ та другої копії Ph-хромосоми. Відсоток таких клітин становив 2–85% усіх проаналізованих. У 3 випадках (№ 24; 25 і 26), в яких відсоток клітин із третім фузійним сигналом перевищував 10% (85; 62 і 11% відповідно) другу копію Ph-хромосоми виявлено при аналізі каріотипу. В 1 випадку (№ 25), крім клітин із сигналами 2Y1R1G та 3Y1R1G, спостерігали клон клітин із нетиповим набором сигналів 3Y2R1G, який може свідчити про наявність додаткової хромосоми 9. Хромосомний аналіз показав наявність extra Ph та 1–3 маркерних хромосом, які могли б походити із хромосоми 9. В останньому з групи із збільшеною кількістю фузійних сигналів випадку (№ 32) дослідження FISH показало 25% клітин із чотирма фу-

Результати каріотипування та FISH обстеженої групи пацієнтів

№ з/п	Попереднє лікування	Результат GTG: t(9;22)	Результат FISH: картина гібридизації (% клітин з фузійним сигналом)	Остаточний діагноз
А. Типова гібридизація				
1	Відсутнє	+	2Y1R1G (96)	ХМЛ ХФ
2	Відсутнє	+	2Y1R1G (94)	ХМЛ ХФ
3	ЦП	+	2Y1R1G (100)	ХМЛ ХФ
4	ЦП	+	2Y1R1G (99)	ХМЛ ФА
5	ЦП	+	2Y1R1G (99)	ХМЛ БК
6	ЦП	+	2Y1R1G (98)	ХМЛ ХФ
7	ЦП	+	2Y1R1G (97)	ХМЛ ХФ
8	ЦП	+	2Y1R1G (97)	ХМЛ ХФ
9	ЦП	+	2Y1R1G (94)	ХМЛ ХФ
10	ЦП	+	2Y1R1G (94)	ХМЛ БК
11	ЦП	+	2Y1R1G (93)	ХМЛ ФА
12	ІМ	+	2Y1R1G (96)	ХМЛ ХФ
13	ІNF	+	2Y1R1G (93)	ХМЛ ХФ
14	ІNF	+	2Y1R1G (91)	ХМЛ ХФ
15	ІNF	+	2Y1R1G (61)	ХМЛ ХФ
16	ІNF	+	2Y1R1G (30)	ХМЛ ХФ
17	ІNF	ВМ	2Y1R1G (100)	ХМЛ ХФ
18	ІNF	ВМ	2Y1R1G (99)	ХМЛ ХФ
19	ЦП	ВМ	2Y1R1G (96)	ХМЛ ХФ
20	ЦП	ВМ	2Y1R1G (92)	ХМЛ ХФ
21	ЦП	ВМ	2Y1R1G (82)	ХМЛ ХФ
22	ЦП	ВМ	2Y1R1G (80)	ХМЛ ХФ
23	ЦП, ІNF, ІМ	ВМ	2Y1R1G (87)	ХМЛ ФА
В. Додаткові фузійні сигнали				
24	ЦП	++	2Y1R1G (15) / 3Y1R1G (85)	ХМЛ ФА
25	ІNF	++	2Y1R1G (35) / 3Y1R1G (21) / 3Y2R1G (41)	ХМЛ ФА
26	ЦП	++	2Y1R1G (75) / 3Y1R1G (11)	ХМЛ ФА
27	ЦП	+	2Y1R1G (96) / 3Y1R1G (2)	ХМЛ ХФ
28	ЦП	+	2Y1R1G (96) / 3Y1R1G (2)	ХМЛ ХФ
29	ЦП	+	2Y1R1G (95) / 3Y1R1G (2)	ХМЛ ХФ
30	ЦП	ВМ	2Y1R1G (85) / 3Y1R1G (3)	ХМЛ ФА
31	ІNF, ІМ	ВМ	2Y1R1G (80) / 3Y1R1G (3)	ХМЛ ХФ
32	ЦП, ІМ	++	2Y1R1G (75) / 4Y (25)	ХМЛ ФА
С. Втрата фузійного сигналу				
35	ЦП	+	1Y1R1G (89) / 2Y1R1G (11)	ХМЛ ФА
34	ЦП	+	1Y1R1G (99); 1Aq (99)	ХМЛ ФА
33	ЦП	ВМ	1Y1R1G (98)	ХМЛ ФА
36	Відсутнє	+	1Y1R2G (97)	ХМЛ ХФ
37	ІNF	+	1Y1R2G (87)	ХМЛ ФА
38	Відсутнє	ВМ	1Y1R2G (82)	ХМЛ ХФ
39	ЦП	-	1Y2R1G (95)	ХМЛ ХФ
40	ІNF	+	1Y2R2G (100)	ХМЛ ХФ
41	ЦП	+	1Y2R2G (97)	ХМЛ ХФ
42	Відсутнє	+	1Y2R2G (94)	ХМЛ ХФ
43	ЦП	ВМ	1Y2R2G (91)	ХМЛ ХФ
44	ІNF	ВМ	1Y2R2G (76) / 2Y2R2G (5)	ХМЛ ФА
Д. Відсутність фузійних сигналів				
45	ЦП, ІNF	-	2R2G	ОМФ
46	ЦП	-	2R2G	ОМФ
47	ЦП	-	2R2G	ОМФ
48	ЦП	-	2R2G	ХММЛ
49	ЦП	-	2R2G	ХММЛ
50	ЦП	ВМ	2R2G	ОМФ
51	ЦП	ВМ	2R2G	ОМФ
52	Відсутнє	ВМ	2R2G	ГЛ

ЦП – цитостатичні препарати; ІNF – інтерферон; ІМ – іматиніб; ВМ – відсутність метафаз; (-) – відсутність транслокації t(9;22); (+) – наявність транслокації t(9;22); (++) – транслокація t(9;22) з додатковою del(22); ХМЛ – хронічна мієлоїдна лейкемія; ХФ – хронічна фаза; ФА – фаза акселерації; БК – бластна криза; ОМФ – остеомиєлофіброз; ХММЛ – хронічна мієломоноцитарна лейкемія; ГЛ – гостра лейкемія.

зійними сигналами та без сигналів, які відповідають нормальним копіям генів *ABL* і *BCR*. В каріотипі таких клітин виявлено відсутність незмінених хромосом 9 і 22, оскільки обидві їх копії були залучені у взаємні транслокації (рис. 3).

Друга група зразків з нетиповою гібридизацією включала 12 пацієнтів, у яких було виявлено наявність одного фузійного сигналу (27% випадків) (див. табл. 1С). У 3 випадках (№ 33; 34 і 35) втрата одного фузійного сигналу супроводжувалася наявністю одиночних сигналів з нормальних генів *ABL* і *BCR* з утворенням гібридизації 1Y1R1G (рис. 4).

Картина гібридизації підтвердилася на метафазних пластинках і означає повну делецію ділянки злиття генів на похідній хромосомі 9, яка містить залишок гена *ABL* і транслокований фрагмент гена *BCR*. Така делеція субмікроскопічна, тому її наявність не виявляється при аналізі каріотипу. У пацієнта № 34 делецію другого фузійного гена на похідній хромосомі 9 було підтверджено за допомогою мітки до гена *ASS*, яка показала наявність одного блакитного сигналу у 99% клітин. Аналіз каріотипу виявив комплексну транслокацію t(2;9;22) (p23;q34;q11), а також додаткові хромосомні зміни – трисомію 8 та ізохромосому 17q (рис. 5).

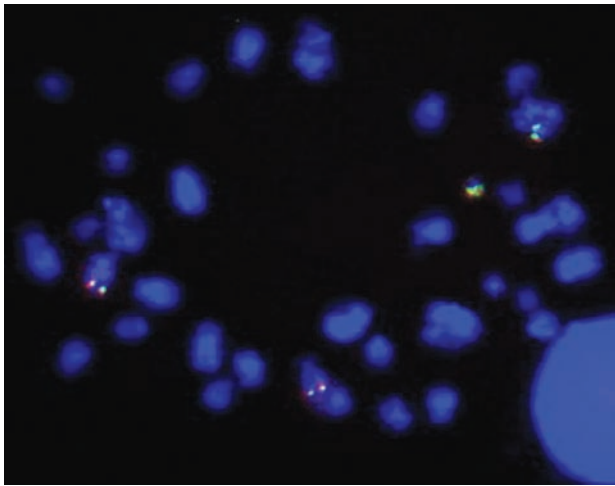


Рис. 3. Метафазна пластинка пацієнтки з подвійною транслокацією t(9;22): картина гібридизації 4Y

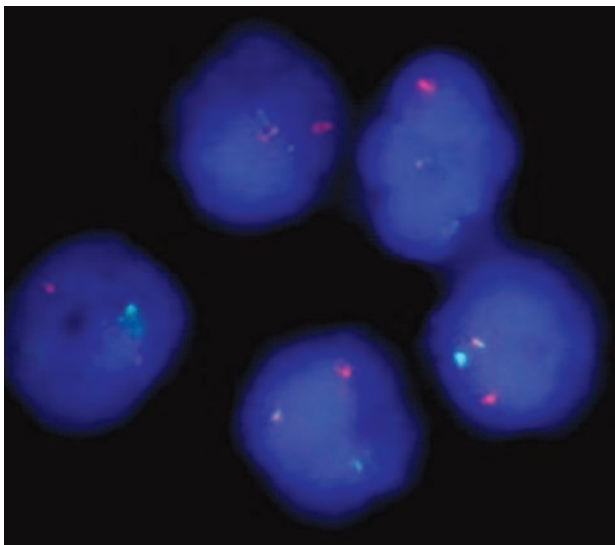


Рис. 4. Картина гібридизації при делеції гена *ABL/BCR*: 1Y1R1G

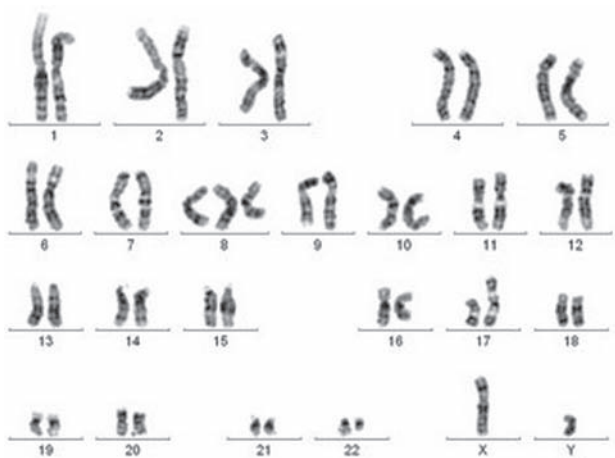


Рис. 5. Каріотип пацієнта №34 – 47,XY,t(2;9;22)(p23;q34;q11),+8,i(17)(q10)

У випадку №33, крім переважної більшості клітин із гібридизацією 1Y1R1G, встановлено наявність субпопуляції клітин 2Y1R1G, в яких другий фузійний сигнал походив із другого маркера Ph, в той час як на похідній хромосоми 9 гібридизації не виявлено.

У трьох наступних пацієнтів (№36; 37; 38) втрачено одного фузійного сигналу супроводжувалася наявністю одного сигналу з нормальної копії гена *ABL* (R) і двох зелених сигналів (ген *BCR*) (рис. 6).

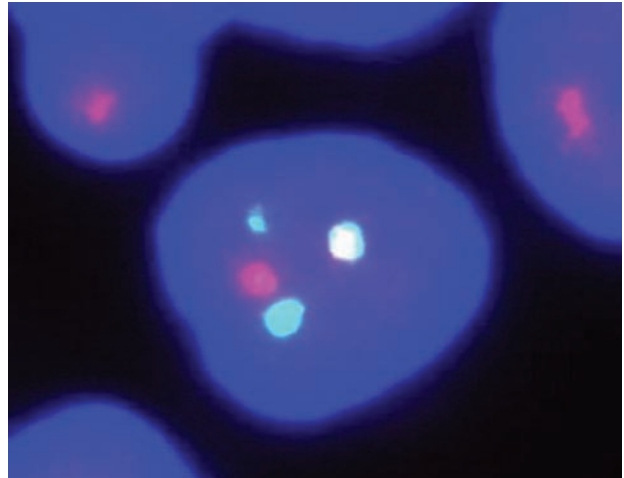


Рис. 6. Картина гібридизації при делеції гена *ABL*: 1Y1R2G

Аналіз метафазних пластинок показав, що ко-локалізаційний жовтий сигнал знаходиться на Ph-хромосомі, а на похідній хромосоми 9 зберігся тільки сигнал з гена *BCR*, транслокованого з хромосоми 22. Отже, у цих 3 випадках втрачалася тільки ділянка гена *ABL*, яка бере участь в утворенні химерного гена на похідній хромосоми 9.

В одному з випадків (№39) разом з одним фузійним сигналом виявлено дві копії гена *ABL* та одну копію гена *BCR*. Аналіз каріотипу показав відсутність транслокації t(9;22) та видимих морфологічних змін в обох копіях 9-ї та 22-ї хромосом. FISH-аналіз на метафазних пластинках встановив наявність фузійного сигналу на одній з морфологічно незмінених хромосом 22, однак величина червоних сигналів на обох хромосомах 9 відрізнялася. Тому можна стверджувати, що в даному випадку відбулася інсерція фрагмента гена *ABL* в ділянку гена *BCR*, яка є субмікроскопічною і не виявляється при хромосомному аналізі.

У 5 пацієнтів виявили картину гібридизації 1Y2R2G (№40; 41; 42; 43 і 44) (рис. 7).

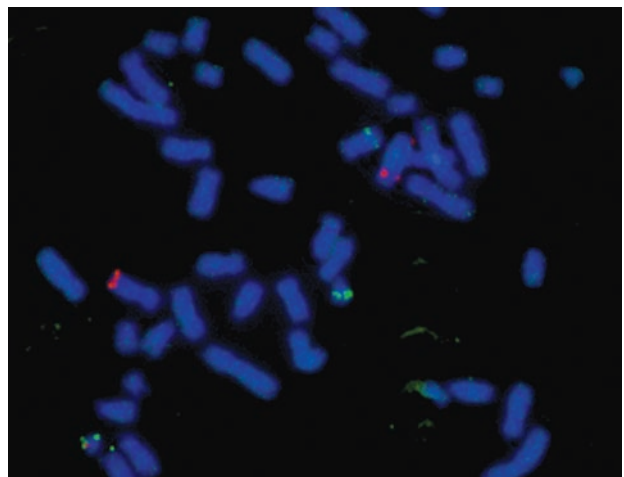


Рис. 7. Метафазна пластинка пацієнтки з варіантною транслокацією t(9;22;10): картина гібридизації 1Y2R2G

Наявність одного фузійного сигналу (1Y) дає підставу припустити існування делеції одного з фузійних регіонів, однак сумарна кількість зелених (G) та червоних (R) сигналів заперечує цю гіпотезу. Аналіз метафаз за допомогою FISH і каріотипування показав наявність комплексних транслокацій між трьома і більше хромосомами з обов'язковим залученням 9 та 22 у трьох пацієнтів. Хромосомний аналіз цих трьох зразків виявив комплексні транслокації $t(9;22;11;1;17)(q34;q11;q1?3;q32;q23)$ у випадку № 40, $t(2;9;22)(q13;q34;q11)$ у випадку № 41 і $t(9;22;10)(q34;q11;q24)$ у випадку № 42 у всіх проаналізованих метафазах. Два досліджених зразки не містили метафазних пластинок. В одному з них, крім клітин із варіантною транслокацією, виявлено невеликий (5%) клон клітин, що містили набір сигналів 2Y2R2G. У цьому випадку другий фузійний сигнал вказував на наявність extra Ph.

Група BCR/ABL-негативних пацієнтів, у яких набір сигналів становив 2R2G, налічувала 8 випадків. У 5 випадках це підтвердилося відсутністю змін в каріотипі, у 3 випадках не було отримано метафазних пластинок. У всіх хворих цієї групи цитогенетичне дослідження проводилося вперше з діагностичною метою. У цих пацієнтів спостерігали спленомегалію, лейкоцитоз з перевагою клітин гранулоцитарного ряду, анемію та гіпертромбоцитоз, що могло відповідати клінічній картині ХМЛ. Після встановлення відсутності химерного гена BCR/ABL на підставі результатів додаткових клініко-лабораторних досліджень у цих хворих було діагностовано мієлофіброз (5 випадків), хронічну мієломоноцитарну лейкемію (2 випадки) та гостру лейкемію (1 випадок).

ХМЛ — перше онкологічне захворювання, при якому у людини були описані специфічні зміни хромосом та зумовлена ними активація протонкогенів, оскільки химерний ген BCR/ABL призводить до змін активності гена BCR, який кодує тирозинкіназу. В обстеженій групі 52 пацієнтів з підозрою на ХМЛ цитогенетичні та/або молекулярно-генетичні докази наявності химерного гена BCR/ABL виявлено у 85% випадків. У решті 15% пацієнтів відсутність цієї характерної зміни співпадає з остаточною діагнозом (мієлофіброз та ін.).

Підтвердженням діагнозу ХМЛ є виявлення у клітинах крові та кісткового мозку характерного цитогенетичного маркера — Ph-хромосоми. Ця зміна виявляється в 95–100% метафаз у 90–95% хворих на ХМЛ. Приблизно у 5–10% випадків виявляють варіантні способи злиття BCR/ABL. Найчастіше це складні транслокації, в яких задіяні додатково одна або більше хромосом і завжди 9 та 22. Іноді трапляється так звана замаскована Ph-хромосома, яка не виявляється стандартним цитогенетичним дослідженням. Це зумовлено перенесенням менших, ніж при стандартній транс-

локації, ділянок хромосом. Описано випадки, коли відбувається транслокація фрагменту хромосоми 9 на 22, але відсутній перенос матеріалу з хромосоми 22 на 9 [6, 7]. У дослідженій нами групі тільки 1 випадок (2%) не виявив наявності маркера Ph, натомість ген BCR/ABL утворився внаслідок інсерції. Таку зміну можна виявити тільки за допомогою FISH.

При аналізі результатів FISH спостерігали наявність різноманітних типів гібридизації. Група пацієнтів з типовим набором сигналів становила 52%, що значно відрізняється від результатів інших повідомлень (72%, [8]). Серед решти 48% пацієнтів із ХМЛ з нетиповою картиною гібридизації переважали випадки з додатковим фузійним сигналом в частині клітин (від 2 до 85% популяції клітин). Випадки з дуплікацією фузійного сигналу становили 21% дослідженої групи. Таку розбіжність ми пояснюємо переважанням у групі з нетиповим набором сигналів пацієнтів, які перебували у фазі акселерації (48%), на відміну від групи з типовими сигналами (13%). Одночасно проведений аналіз каріотипу показав наявність додаткової копії Ph-хромосоми тільки у 4 пацієнтів, усі вони перебували у фазі акселерації. У цьому відношенні дослідження FISH є набагато більш чутливим методом, який дозволяє виявити навіть невеликий клон (менше 10% клітин), що виходить за межі можливостей хромосомного аналізу. Іноді можна спостерігати 4 і навіть 5 фузійних сигналів, які свідчать про наявність, відповідно 2 і 3 додаткових Ph-хромосом. Як відомо, extra Ph є другою за частотою (до 30%) додатковою аномалією при ХМЛ після трисомії 8 і утворюється шляхом дуплікації вихідного маркера Ph [7, 9].

Наступною за чисельністю в нашому дослідженні була група з комплексними транслокаціями (КТ). Механізм їх утворення, клінічні прояви та прогностичне значення у хворих із ХМЛ активно обговорюються в доступній літературі. Комплексні транслокації із залученням трьох і більше хромосом виявляють у 5–10% хворих [10]. У багатьох випадках КТ супроводжуються делеціями в залучених хромосомах. Встановлено, що частота делецій у хворих із комплексними транслокаціями є вищою (40–60%) порівняно з іншими пацієнтами [11].

Випадки комплексних транслокацій, які маскують типову картину $t(9;22)$, становили 14% серед дослідженої нами групи хворих на ХМЛ. У 4 з них наявність змін хромосом 9 і 22 з типовими для ХМЛ точками розриву виявлено як при дослідженні каріотипу, так і при FISH (в одному з випадків внаслідок делеції картина гібридизації відрізнялася від такої при комплексних транслокаціях). У 2 інших пацієнтів застосування методу FISH було достатнім для виявлення таких змін.

До окремої групи було віднесено пацієнтів із частковими або повними делеціями другого про-

дукту транслокації в змінений хромосомі 9 (14%). Різні автори подають зовсім різні показники частоти хворих з делеціями — від 9 до 30% всіх проаналізованих випадків, найчастіше наводиться частота 15% [12, 13, 15, 16]. Результати багатьох досліджень свідчать, що делеції в ділянці гена *ABL/BCR* відбуваються одночасно з появою транслокації t(9;22) і, таким чином, не є вторинними змінами, які з'являються під час прогресії хвороби [12, 13].

Делеції в регіоні *ABL/BCR* субмікроскопічні й можуть охоплювати фрагменти довжиною від декількох тисяч до кількох мільйонів пар основ [12], хоча описані випадки з делеціями понад 10 млн п.о., які візуалізувались при хромосомному аналізі [14]. Молекулярні дослідження показали, що мінімальний делетований регіон на хромосомі 9 включає ген *ASS*, який розміщений близько до гена *ABL*, і ген *IIGLL1*, що знаходиться поруч із геном *BCR* на хромосомі 22 [13].

Картина FISH при аналізі випадків з делеціями може бути трьох різновидів [16]. У більшості випадків відбувається втрата послідовностей по обидві сторони від точки розриву на *der(9)* — фрагменту хромосоми 9 і перенесеної частини хромосоми 22 (набір сигналів 1Y1R1G, який свідчить про повну втрату гібридної ділянки *ABL/BCR*). Рідше втрачається тільки ділянка на хромосомі 9 (гібридизація 1Y1R2G, втрата фрагменту гена *ABL*) і в поодиноких випадках описані делеції тільки фрагмента 22-ї хромосоми (гібридизація 1Y2R1G, втрата фрагменту гена *BCR*). У нашому дослідженні спостерігали часткову делецію в *der(9)* у 3 пацієнтів і повну також у 3 пацієнтів. Гібридизація за типом 1Y2R1G була виявлена тільки в 1 випадку (2%), проте при порівнянні з результатом каріотипування виявилось, що це не делеція, а субмікроскопічна інсерція фрагменту хромосоми 9 в 22 (так звана замаскована Ph-хромосома). Відомо, що Ph-негативна *BCR/ABL*-позитивна ХМЛ трапляється з частотою приблизно 5% і за клінічним перебігом не відрізняється від класичної ХМЛ [6, 7].

Сучасні стандарти діагностики гемобластозів потребують широкого використання методів класичної та молекулярної цитогенетики. За даними ГНЦ РАМН, встановлення діагнозу ХМЛ у 16% випадків було неможливим без застосування FISH [17], що відповідає нашим результатам. Вважається, що FISH обов'язково слід проводити при першому обстеженні для виявлення делецій в 9q та в разі неуспішності стандартного цитогенетичного дослідження [18].

ВИСНОВКИ

1. В обстеженій групі пацієнтів з підозрою на ХМЛ діагноз підтверджено за допомогою дослідження методом FISH у 85% випадків. Серед пацієнтів, у яких було проаналізовано каріотип, результат хромосомного аналізу збігався з резуль-

татом FISH, за винятком одного хворого, у якого ген *BCR/ABL* утворився внаслідок субмікроскопічної інсерції.

2. При аналізі результатів FISH виявлено типову та нетипову картину гібридизації у співвідношенні 52 та 48% відповідно. Нетипова гібридизація була наслідком дуплікації маркера Ph, комплексних транслокацій та повних або часткових делецій в ділянці злиття генів *ABL* і *BCR* в похідній хромосомі 9.

3. У підгрупі хворих із дуплікацією Ph-хромосоми одночасне виявлення цієї зміни методами каріотипування та FISH було можливим при відсотку клітин з extra Ph не менше 10%. Це пояснюється набагато вищою чутливістю FISH порівняно з класичним цитогенетичним методом.

4. Делеції в ділянці гена *ABL/BCR* ідентифікували в 14% випадків, що узгоджується з повідомленнями інших авторів. Застосування мітки LSI *BCR/ABL* Dual Colour Dual Fusion Probe є достатнім для виявлення таких делецій. У складних випадках доцільним є додаткове дослідження з міткою LSI 9q34ASS.

5. Картина гібридизації може вказувати на наявність комплексної транслокації, проте для її точної ідентифікації необхідний аналіз каріотипу. Крім змін, до яких залучені точки розриву 9q34 та 22q11, в комплексних транслокаціях ідентифіковано участь хромосом 2 (2 випадки), 10 (1 випадок), а в одному випадку також одночасно 1; 11; 17-ї хромосом.

6. Для повноцінної цитогенетичної діагностики ХМЛ необхідно одночасно проводити як класичне цитогенетичне дослідження, так і FISH. Ці методи не замінюють, а доповнюють один одного.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Pieńkowska-Grela B** і **wsp.** Analiza cytogenetyczna w nowotworach hematologicznych. Poradnik, Centrum Onkologii. Warszawa, 2004.
2. **Зерова-Любимова ТЕ, Горovenko НГ.** Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини (методичні рекомендації). Київ, 2003. 24 с.
3. **Wang HC, Fedoroff S.** Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nat New Biol* 1972; **235**: 52–3.
4. **ISCN 2005.** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature / Ed F Mitelman / Basel: S Karger, 2005. 128 p.
5. **Pinkel D, Straume T, Gray JW.** Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **83**: 2934–8.
6. **Клиническая онкогематология** / Под ред МА Волковой / Москва: Медицина, 2001. 576 с.
7. **Гематология: новейший справочник** / Под ред КМ Абдулкадырова / Москва: Эксмо; СПб: Сова, 2004. 928 с.
8. **Lim TH, Tien SL, Lim P, et al.** The incidence and patterns of *BCR/ABL* rearrangements in chronic myeloid leukaemia (CML) using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Ann Acad Med Singapore* 2005; **34**: 533–8.
9. **The AGT Cytogenetics Laboratory Manual** / Eds MJ Barch, T Knutsen, JL Spurbeck (3d ed)/ Lippincott-Raven, 1997. 668 p.
10. **Gorusu M, Benn P, Li Z, et al.** On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; **173**: 97–106.

*A.S. Lukyanova, Z.V. Maslyak, M.O. Valchuk,
V.E. Loginsky, B. Pieńkowska-Grela*

Summary. *The study was performed in 52 patients with suspected chronic myeloid leukemia (CML) to detect BCR/ABL fusion gene and to evaluate the incidence and diagnostic significance of different hybridization patterns. BCR/ABL rearrangement was identified in 85% of patients; with typical FISH pattern in 52% and atypical in 48% of the cases. Atypical hybridization resulted from additional fusion signals in 21% of specimens, variant translocations in 11%, ABL gene deletions in 7%, ABL/BCR gene deletions in 5%, an insertion of BCR gene into ABL in 2% and a variant translocation with a concomitant ABL/BCR deletion in 2%.*

Key Words: chronic myeloid leukemia, diagnostics, FISH, Ph-chromosome, BCR/ABL gene, ASS gene.

Адреса для листування:

Лук'янова А.С.
79044, Львів, вул. Генерала Чупринки, 45
ДУ «Інститут патології крові
та трансфузійної медицини АМН України»

11. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Talpaz M, *et al.* Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognosis significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2005; **105** (6): 2281–5.

12. Sinclair PB, Nacheva ER, Leversha M, *et al.* Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; **95** (3): 738–44.

13. Storlazzi CT, Specchia G, Anelli L, *et al.* Breakpoint characterization of der(9) deletions in chronic myeloid leukemia patients. *Gen Chrom Cancer* 2002; **35**: 271–6.

14. Xinth PT, Vu HA, Nghia H, *et al.* Coexistence of Philadelphia chromosome positive cells with and without der(9) deletion in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; **164**: 122–7.

15. Huntly BJP, Reid AG, Bench AJ, *et al.* Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2001; **98** (6): 1732–8.

16. Pieńkowska-Grela B, Woroniecka R, Doroszuk K, *et al.* Częstość delecji submikroskopowego obszaru fuzji ABL/BCR w badaniu rutynowym i przy użyciu sond specyficznych u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową. *Acta Haematol Pol* 2008; **39** (1): 99–110.

17. Prejzner W, Sacha T, Salamanczuk Z, *et al.* Standard postępowania diagnostycznego i terapeutycznego u chorych z przewlekłą białaczką szpikową w Polsce w roku 2007, Standard of diagnostic and therapeutic procedures in patients with chronic myeloid leukemia in Poland in 2007. *Acta Haematol Pol* 2007; **38** (1): 107–22.

18. Домрачева А, Асеева Е. Роль цитогенетических исследований при лечении хронического миелолейкоза ингибиторами тирозинкиназ. *Гематол трансфузиол* 2007; **52** (2): 25–7.