

6. Lechner K. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults / K. Lechner, Jager U. // Blood. – 2010. – Vol. 116, no11. – P. 1831–1838.

7. Majumdar G. Role of splenectomy in chronic lymphocytic leukemia with massive splenomegaly and cytopenia / G. Majumdar, A.K. Singh // Leuk Lymphoma. – 1992. – Vol. 1-2. – P. 131

8. Splenectomy in advanced for chronic lymphocytic leukemia: a single institution experience with 50 patients / T.F.Jr. Neal, A. Tefferi, T.E. Witzig [et al.] // Am J Med. – 1992. – Vol. 93, no 4. – P. 435–440.

9. Autoimmune hemolytic anemia in patients with non-Hodgkin's lymphoma: characteristics and significance / S. Sallah, G. Sigounas, P. Vos [et al.] // Ann Oncol. – 2000. – Vol. 11, no 12. – P. 1571–1577.

10. Sallah S. Future development of lymphoproliferative disorders in patients with autoimmune hemolytic anemia / S. Sallah, J.Y. Wan, L.R. Hanrahan // Clin Cancer Res. – 2001. – Vol. 7, no 4. – P. 791–794.

11. Splenectomy in patients with malignant non-Hodgkin's lymphoma / N. Xiros, T. Economopoulos, C. Christodoulidis [et al.] // Eur J Haematol. – 2000. – Vol. 64, no 3. – P. 145–150.

Надійшла 10.11.2017 року

УДК: 576.312.36+616.155.392.2-037-071

ДІАГНОСТИЧНЕ ТА ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ СПРИЯТЛИВИХ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ У ХВОРИХ НА ГОСТРУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ

О.В. Зотова¹, А.С. Лук'янова¹, М.О. Вальчук¹,
І.С. Ванько¹, С.В. Осідач¹, М.М. Римар¹,
Ю.С. Кароль², В.Є. Логінський¹

¹ – ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини
НАМН України», Львів;

² – Комунальна 5 міська клінічна лікарня, Львів

Резюме. Цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку та/або периферичної крові проведено у 105 хворих на гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ). Хромосомні аномалії різного характеру виявлено у 57% хворих. З урахуванням аналізу каріотипу хворих класифіковано на три групи ризику: група хворих з несприятливими цитогенетичними маркерами, група проміжного ризику без прогностично значущих маркерів та група зі сприятливими факторами прогнозу. До групи ГМЛ із сприятливим клінічним прогнозом увійшли випадки із збалансованими хромосомними аберациями – $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$ та $inv(16)(p13q22)$. Цитогенетичні методи повинні бути включені у стандарти

обстеження хворих на ГМЛ для діагностики, прогнозування перебігу та підбору оптимальної тактики лікування.

Ключові слова: *гостра мієлоїдна лейкемія, сприятливі цитогенетичні маркери, каріотип, цитогенетична аберація, діагноз, прогноз.*

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF FAVORABLE CYTOGENETIC PROGNOSTIC MARKERS IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

**O. Zotova¹, A. Lukyanova¹, M. Valchuk¹, I. Vanko¹, S. Osidach¹,
M. Rymar¹, Y. Karol², V. Loginsky¹**

¹ – *SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine», Lviv;*

² – *Communal Clinical Hospital № 5, Lviv*

Resume. *A cytogenetic analysis of bone marrow and/or peripheral blood cells from 105 patients with acute myeloid leukemia (AML) was performed. Chromosomal abnormalities of various kinds were found in 57% of the patients. According to the karyotype analysis patients were classified by risk groups: the group of patients with unfavorable cytogenetic markers, the intermediate risk group without significant prognostic markers and the group with favorable prognostic factors. Cases with balanced chromosomal aberrations – t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q11-21) and inv(16)(p13q22) were included to the group of AML with favorable clinical prognosis. Thus, cytogenetic methods should be included in the standard examination of patients with AML for diagnosis, prognosis and selection the optimal treatment strategy.*

Key words: *acute myeloid leukemia, favorable cytogenetic markers, karyotype, cytogenetic aberration, diagnosis, prognosis.*

Вступ. Гострі мієлоїдні лейкемії характеризуються дуже різноманітним клінічним перебігом і різною чутливістю до терапії. Ключова подія у розвитку гострих ГМЛ – перебудови геному клітин-попередників. На сучасному рівні знань стала очевидною потреба переоцінки відомих прогностичних критеріїв, що базуються, переважно, на клінічних та рутинних гематологічних тестах і набула актуальності проблема розробки нових прогностичних систем, що паралельно із загальноприйнятими дослідженнями, враховували б найбільш специфічні ознаки патологічних клонів: геном клітин лейкемічного клону та його аномалії. Пошкодження геному лейкемічних клітин в основному представлені хромосомними перебудовами (транслокації, інверсії, делеції, моносомії, додаткові копії хромосом та ін.) і можуть бути виявлені за допомогою методів класичної цитогенетики та молекулярно-генетичних методів. Хромосомні аномалії

різного характеру виявляються у 50–60% дорослих хворих на ГМЛ. Спектр генетичних перебудов при цих недугах має важливе діагностичне та прогностичне значення. На підставі дослідження каріотипу хворого встановлюється група ризику перебігу хвороби, а також підбирається ефективна схема лікування. За прогностичним значенням хромосомних перебудов виділяють три основні групи хворих на ГМЛ: з несприятливими цитогенетичними маркерами, проміжного ризику та з сприятливими факторами прогнозу. До останньої групи відносять випадки ГМЛ із збалансованими хромосомними аберациями – $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$, $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ [2, 4, 8].

Метою роботи була оцінка діагностичного та прогностичного значення перебудов каріотипу у хворих на ГМЛ, зокрема $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$ та $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$.

Матеріали і методи дослідження. Цитогенетичні дослідження злоякісних клітин проведено у 105 пацієнтів з ГМЛ. Діагноз у хворих встановлено на основі клініко-гематологічних, цитологічних та імунофенотипових досліджень. Обстежено хворих віком від 18 до 84 років, серед них 62 чоловіка і 43 жінки.

Зразки бластних клітин від хворих отримували шляхом аспіраційної біопсії кісткового мозку та під час венопункції. Використовували загальноприйнятий метод 24- та 48-годинного культивування клітин кісткового мозку та/або периферичної крові *in vitro*. Обробку клітин проводили за загальноприйнятою методикою, яка включала дію колхіцину, гіпотонізацію, фіксацію і приготування препаратів. Аналіз метафазних хромосом проводили із застосуванням G-методики диференційного забарвлення фарбою Райта [1, 3, 12]. Забарвлені препарати аналізували при збільшенні $\times 1000$ під світловим мікроскопом Olympus BX41 (Olympus, Японія) з використанням системи для хромосомного аналізу CytoVision (Applied Imaging, Великобританія). Проводили аналіз не менше 10 метафазних пластинок. Лише в одному випадку було проведено дослідження меншої кількості метафаз внаслідок низької мітотичної активності пухлинних клітин. При аналізі та описі каріотипу дотримувались критеріїв *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* – ISCN, 2009 [10].

У частині випадків мітози були відсутні або ж їх якість незадовільна. За відсутності придатних до аналізу метафазних пластинок додатково застосовували метод флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH) з відповідними мітками. Підготовку препаратів та процедуру гібридизації здійснювали за Pinkel et al. [9] з урахуванням рекомендацій виробника мітки. Аналізували не менше 200 клітин.

Результати та їх обговорення. Дослідна група включила 105 пацієнтів. У цій групі аномальний каріотип виявлено у 53 (50%) випадках. Серед них: у 17 хворих встановлено наявність множинних змін каріотипу (≥ 3), у 9 пацієнтів – двох перебудов у каріотипі та у 27 – однієї перебудови. У 7 хворих (2 випадки ГМЛ з нормальним каріотипом та 5 випадків ГМЛ без придатних для аналізу метафазних пластинок) дослідження FISH показало наявність химерного гена *PML/RARa*. Загалом, у 60 (57%) з 105 обстежених пацієнтів спостерігали різного характеру цитогенетичні перебудови. У зразках, отриманих від 45 (43%) хворих, виявлено нормальний каріотип без цитогенетично видимих змін.

Отримані результати цитогенетичного аналізу дозволили розподілити пацієнтів з ГМЛ на три групи ризику перебігу хвороби. Перша група включила 25 хворих на ГМЛ з несприятливим цитогенетичними маркерами (перебудови 3q, -5, -7, del(5q), del(17p), t(9;22)(q34;q11), комплексний каріотип (≥ 3 аномалій)). До другої групи ввійшли 62 пацієнти, у яких не було виявлено прогностично значущих цитогенетичних маркерів. Це група з проміжним або нез'ясованим прогнозом, до її складу включено хворих на ГМЛ з нетиповими або рідкісними хромосомними аберациями та з нормальним каріотипом. Третя група об'єднала 18 хворих на ГМЛ зі сприятливими факторами прогнозу – ГМЛ з t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q11-21), inv(16)(p13q22).

Серед 105 обстежених хворих прогностично сприятливі цитогенетичні аберации виявлено у 18 пацієнтів, а саме: t(15;17)(q22;q11-21) та/або ген *PML/RARa* (12 випадків), t(8;21)(q22;q22) (5 випадків), inv(16)(p13q22) (1 випадок). Для виявлення цих перебудов у 10 хворих застосовано класичний цитогенетичний метод, у 5 хворих – тільки метод FISH та у 3 – як аналіз каріотипу, так і метод FISH.

Транслокацію t(15;17)(q22;q11-q21) виявлено у 5 випадках (рис. 1). У 4 пацієнтів це була єдина перебудова у каріотипі, у одного хворого, крім t(15;17)(q22;q11-q21), виявлено додаткову аберацию – тетрасомію хромосоми 8. У 2 пацієнтів виявлено нормальний каріотип без цитогенетично видимих змін, однак дослідження FISH показало наявність химерного гена *PML/RARa* (рис. 2). В 5 хворих у зв'язку з відсутністю в дослідженому матеріалі придатних для аналізу метафазних пластинок виконано лише дослідження FISH, яке показало наявність химерного гена *PML/RARa*. Загалом у 12 пацієнтів спостерігали наявність транслокації t(15;17)(q22;q11-21) та/або гена *PML/RARa*.

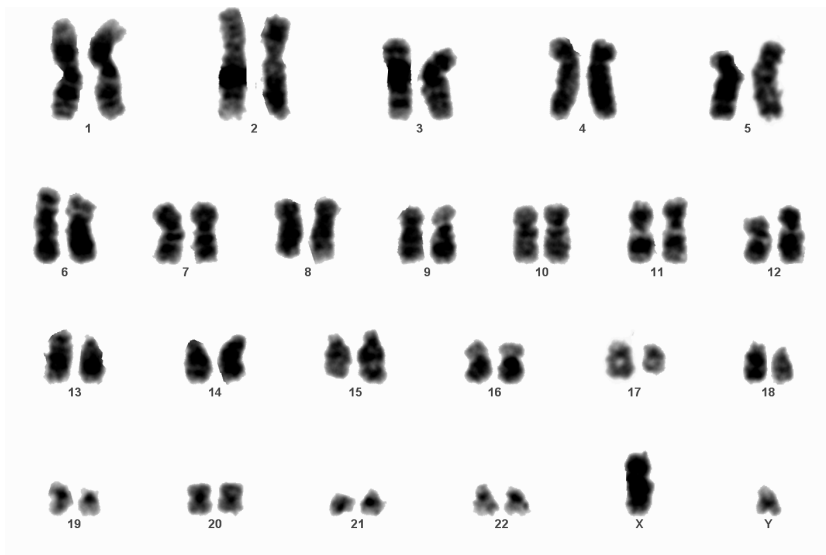


Рис. 1. Транслокація $t(15;17)(q22; q11-21)$

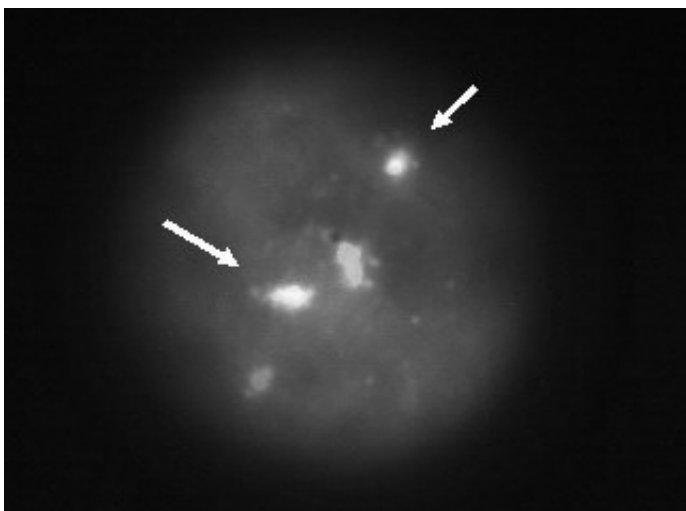


Рис. 2. Результат FISH-аналізу на інтерфазних ядрах для виявлення гена $PML/RAR\alpha$ із застосуванням флуоресцентної мітки $PML/RAR\alpha$ DC DF (Vysis)

Транслокацію $t(8;21)(q22;q22)$ виявлено у 5 хворих (рис. 3). В одного з них це була єдина перебудова в каріотипі. У 4 хворих, крім $t(8;21)(q22;q22)$, спостерігали додаткові зміни – відсутність Y-хромосоми (2 випадки) (рис. 3), делецію довгого плеча 9 хромосоми $del(9)(q21-22)$ (1 випадок), комплексний каріотип (1 випадок).

Інверсію 16 хромосоми $inv(16)(p13q22)$ виявлено в одному випадку, крім якої також спостерігали наявність додаткової перебудови в каріотипі – трисомії хромосоми 10 (рис. 4). Транслокації $t(16;16)(p13;q22)$ не виявлено у жодного з обстежених хворих.

За повідомленнями літератури при цитогенетичному дослідженні злоякісних клітин клональні хромосомні аномалії різного характеру виявляються у 50–60% дорослих хворих на ГМЛ [2, 8]. Слід зазначити, що в дослідній групі (105 пацієнтів) аномалії каріотипу спостерігали у 57% хворих на ГМЛ, і цей показник збігається з даними літератури.

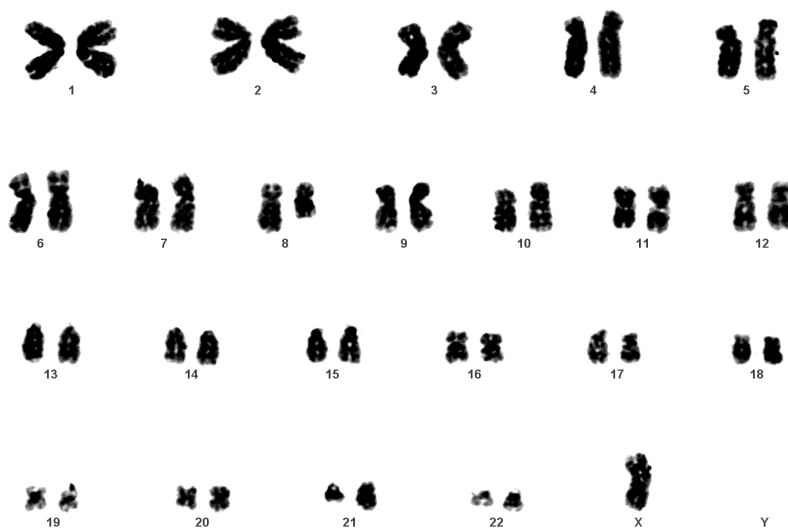


Рис. 3. Транслокація $(8;21)(q22; q22)$, відсутність Y-хромосоми

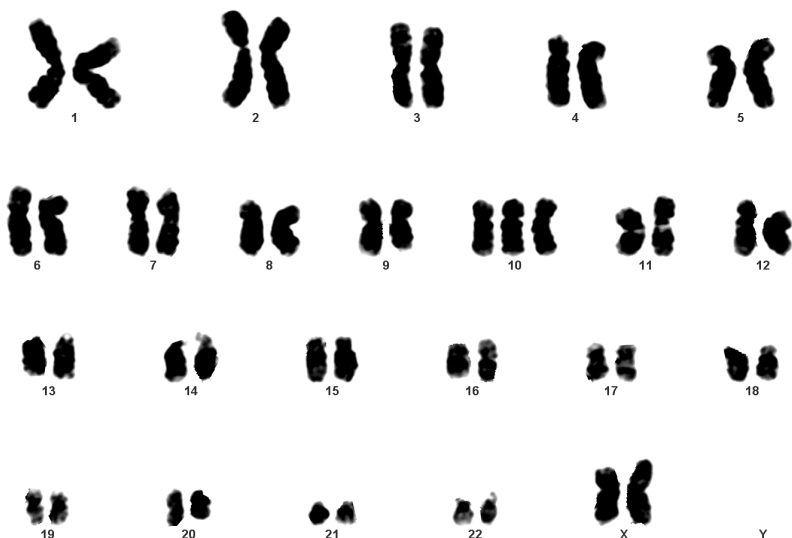


Рис. 4. Інверсія 16 хромосоми *inv(16)(p13q22)*, трисомія 10 хромосоми

Транслокація $t(15;17)(q22;q11-21)$ та відповідні химерні гени *PML/RARa* і *RARa/PML* строго специфічні для гострої промієлоцитарної лейкемії (ГПЛ; М3 варіант ГМЛ за FAB класифікацією), їх виявляють у 91–95% усіх хворих на ГПЛ. Утворення химерного гена *PML/RARa* та відповідного химерного білка *PML/RARa* відіграє ключову роль в патогенезі ГПЛ. Внаслідок цього зупиняється нормальне дозрівання промієлоцитів. Виявлення вищевказаної перебудови у хворих на ГМЛ передбачає включення у схеми поліхіміотерапії диференціального агента – повної *транс*-ретиноевої кислоти (АТРА). Відкриття цільової дії АТРА стало ключовою подією у лікуванні ГПЛ, яку до того вважали фатальною хворобою. За надлишку АТРА молекула химерного білка *PML/RARa* модифікується, а диференціація клітин відновлюється. Використання АТРА значно поліпшило результати лікування ГПЛ: в 70–90% випадків вдається досягнути багаторічної ремісії. В 29–37% випадків, крім $t(15;17)(q22;q11-21)$, спостерігають додаткові хромосомні аномалії, а саме – трисомію 8, $del(9q)$, ізодериват хромосоми 17 [5, 6, 7]. Ми виявили лише в 1 (8%) із 12 обстежених пацієнтів додаткову аномалію (тетрасомію 8 хромосоми), оскільки каріотипування було проведене не у всіх пацієнтів у зв'язку з відсутністю придатних для аналізу метафазних пластинок. Опи-

сано, що наявність таких додаткових аномалій, як трисомія 8 та ізодериват 17 хромосоми, на прогноз перебігу хвороби не впливає, тоді як $del(9q)$ – погіршує прогноз [5, 6].

Транслокація $t(8;21)(q22;q22)$ виявляють у 7% випадків ГМЛ та у 40% пацієнтів з М2 варіантом ГМЛ за FAB класифікацією. Внаслідок вказаної транслокації утворюється химерний ген *AML1/ETO* та відповідний химерний білок AML1/ETO, який блокує процес транскрипції та зупиняє нормальне дозрівання клітин. В 40% випадків, крім $(8;21)(q22;q22)$, спостерігають додаткові аномалії, а саме – втрату X- або Y-хромосоми, делецію довгого плеча 9 хромосоми $del(9q)$, додаткові копії хромосом 8 і 21 та ін. [7, 11]. Так, у 4 (80%) із 5 хворих з $t(8;21)(q22;q22)$, ми спостерігали додаткові аномалії – втрату Y-хромосоми (2 випадки), делецію довгого плеча 9 хромосоми $del(9)(q21-22)$ (1 випадок), множинні зміни каріотипу (1 випадок). За повідомленнями літератури відсутність Y-хромосоми не впливає на прогноз перебігу захворювання. У групі хворих з делецією $del(9q)$ відзначено збільшену в 2 рази частоту рецидивів [7, 11].

Аномалії інверсія $inv(16)(p13q22)$ та транслокація $t(16;16)(p13;q22)$ специфічні для М4 варіанту ГМЛ за FAB класифікацією. Інверсія 16 хромосоми характерна для третини хворих на цей варіант ГМЛ. Транслокацію $t(16;16)(p13;q22)$ виявляють значно рідше. В результаті вищевказаних перебудов утворюється химерний ген *CBFB/MYH11* та відповідний химерний білок CBFB/MYH11, який блокує процес транскрипції та зупиняє нормальне дозрівання нейтрофілів. У половині випадків, крім $inv(16)(p13q22)$, також спостерігають додаткові перебудови – додаткові копії хромосом 8, 21 та 22 [5, 7]. У обстеженого пацієнта з $inv(16)(p13q22)$, крім інверсії 16, ми спостерігали додаткову копію 10 хромосоми.

Семеро хворих на ГМЛ із сприятливими цитогенетичними маркерами померли раптово, 5 хворих – перебувають в ремісії, ще 6 хворих – продовжують лікування. У 4 хворих на ГМЛ в якості індукційної та підтримуючої терапії було застосовано ATRA в поєднанні з антрациклінами, що дозволило швидко досягти ремісії з тривалим періодом безрецидивного виживання. Це підтверджує сприятливість транслокації $t(15;17)(q22;q11-q21)$ при включенні ATRA в схеми лікування ГМЛ, що збігається з даними літератури [2, 7].

Висновки

Цитогенетичні дослідження дозволили виявити асоційовані з ГМЛ цитогенетичні аномалії у 57% хворих. На основі аналізу каріотипу хворих класифіковано на групи ризику: група хворих з несприятливими цитогенетичними маркерами, група середнього ризику з маркерами проміжного

прогнозу та група із сприятливими факторами прогнозу. До групи ГМЛ із сприятливим клінічним прогнозом включено випадки із збалансованими хромосомними абераціями – t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q11-21) та inv(16)(p13q22). Розподіл пацієнтів на прогностичні групи дозволяє підібрати найоптимальнішу тактику їх лікування. Таким чином, встановлено високу інформативність цитогенетичних методів дослідження для діагностики, прогнозування перебігу та підбору тактики лікування ГМЛ, що свідчить про необхідність їх включення до переліку обов'язкових методів обстеження хворих на ГМЛ.

Література

1. Андреева С.В. Стандарты анализа препаратов хромосом при неоплазиях кроветворения (методичні рекомендації) / С.В. Андреева, В.Д. Дроздова. – К., 2007. – 44 с.
2. Ольшанская Ю.В. Хромосомные перестройки при острых лейкозах / Ю.В. Ольшанская, Е.В. Домрачева. – М.: МЕДпресс-информ, 2006. – 112 с.
3. Analiza cytogenetyczna w nowotworach hematologicznych (poradnik) / B. Pieńkowska-Grela, J. Brycz-Witkowska, E. Chmarzyńska-Mróz [i wsp.]. – Warszawa: Centrum Onkologii, 2004. – 59 s.
4. Bain B.J. Leukaemia diagnosis. 4th edn / B.J. Bain. – NY: Wiley-Blackwell, 2010. – 403 p.
5. Balanced chromosome abnormalities inv(16) and t(15;17) in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: report from an International Workshop. Gen. Chromosom. / M.K. Andersen, R.A. Larson, N. Mauritzson [et al.] // Cancer. – 2002. – Vol. 33, № 4. – P. 395-400.
6. Cytogenetic analysis and FISH of terminal deletion of the long arm of chromosome 9 in a patient with acute promyelocytic leukemia / G. Vasquez-Palacio, O. Botero, M. Sierra, et al. // Medicina Universitaria. – 2009. – Vol. 11, № 44. – P. 193-197.
7. Heim S. Cancer cytogenetic. 3rd edn. / S. Heim, F. Mitelman. – NY: Wiley-Blackwell, 2009. – 736 p.
8. Mrozek K. Cytogenetics in acute leukemia / K. Mrozek, N.A. Heerema, C.D. Bloomfield // Blood Rev. – 2004. – Vol. 18. – P. 15-36.
9. Pinkel D. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization / D. Pinkel, T. Straume, J.W. Gray // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 83. – P. 2934-2938.
10. Shaffer L. S. ISCN 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature / L.S. Shaffer, M.L. Slovak, L.J. Campbell. – Basel: S. Karger, 2009. – 138 p.
11. The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, specifically represses the transcription of the p14ARF tumor suppressor in acute myeloid leukemia / B. Linggi, C. Muller-Tidow, L. van de Locht [et al.] // Nature Medicine. – 2002. – Vol. 8, № 7. – P. 743-750.
12. Wang H. C. Banding in human chromosomes treated with tripsin / H.C. Wang, S. Fedoroff // Nat. New Biol. – 1972. – Vol. 235. – P. 52-53.

Надійшла 07.11.2017 року.