

М.Р. ЛОЗИНСЬКА¹, З.В. МАСЛЯК²,
Л.М. ЛУКАВЕЦЬКИЙ², О.М. ЦЯПКА²,
Р.Ю. ЛОЗИНСЬКИЙ³

¹ Інститут спадкової патології АМН України, Львів

² Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України,
Львів

³ Національний медичний університет ім. Данила Галицького, Львів

ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ДОДАТКОВИХ ХРОМОСОМНИХ АНОМАЛІЙ У Ph ПОЗИТИВНИХ КЛІТИНАХ КІСТКОВОГО МОЗКУ ПРИ ХРОНІЧНИЙ МІЕЛОЇДНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ



Вивчали прогностичне значення поєднання різних хромосомних аномалій, а також геномних мутацій у Ph-позитивних пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією. Всього провели 49 цитогенетичних досліджень аспірату кісткового мозку від 35 пацієнтів (11 хворих обстежено в динаміці). Додаткові аномалії хромосом були виявлені у 25,07 % випадків, причому приблизно 80 % аномалій з'являлись на стадії бластної кризи (БК). Найчастішою додатковою аномалією хромосом на стадії БК була extra Ph-хромосома, трисомія 8-ї та 19-ї хромосом. Негативне прогностичне значення в перебігу захворювання мала поява клональної різноманітності клітин, підвищеної частоти геномних мутацій та мікрохромосом.

© М.Р. ЛОЗИНСЬКА, З.В. МАСЛЯК, Л.М. ЛУКАВЕЦЬКИЙ,
О.М. ЦЯПКА, Р.Ю. ЛОЗИНСЬКИЙ, 2005

Вступ. Дослідження хромосомних аномалій при мієлопроліферативних захворюваннях (МПЗ) має важливе значення для ранньої діагностики, прогнозування перебігу та пізнання природи неопластичного процесу. До МПЗ відносять хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), що виникає внаслідок неопластичної трансформації поліпотентної стовбурової гемопоетичної клітини. Це приводить до пошкодження всіх клітин кісткового мозку, включаючи гранулоцити, еритроїдні клітини і мегакаріоцити. ХМЛ спостерігають у будь-якому віці, однак найчастіше захворювання трапляється у дорослих [1]. Захворюваність на хронічну мієлоїдну лейкемію в Україні на 100 тис. населення за даними гематологічної служби за 1999 р. становить 1,33 (абс. число 532), поширеність — 5,84 (абс. число 2336). Показник захворюваності на дану патологію у Львівській області на 100 тис. населення становить 1,46 і дещо перевищує показник по Україні; поширеність є нижчою, ніж в Україні — 5,27. Найвищою в Західному регіоні виявилась захворюваність у Тернопільській області (3,59) [2].

Приблизно 90 % хворих ХМЛ є носіями специфічного хромосомного маркера — Ph+філадельфійської хромосоми, утвореної в результаті транслокації t(9;22)(q34;q11). Дана перебудова — це реципрокний обмін делетованими ділянками BCR, що знаходяться на хромосомі 22 в локусі q11, і c-ABL протоонкогена — на хромосомі 9q34. В результаті такого обміну утворюється химерний bcr-abl ген на 22q і ген abl-bcr на 9q+ [3]. У 10 % хворих Ph+ хромосому не вдається виявити традиційними цитогенетичними методами, лише за допомогою методу флуоресцентної гібридизації in situ (FISH) можна ідентифікувати химерний BCR-ABL ген. Перебіг ХМЛ носить прогресуючий характер. Згідно з клоновою природою ХМЛ виділяють декілька стадій: хронічну, акселерації, бластну кризу [1]. Стадії переходу можуть супроводжуватися змінами на хромосомному рівні. В окремих випадках поява клонів клітин із хромосомними аномаліями випереджує клінічну маніфестацію бластної кризи та інші характерні зміни периферійної крові і кісткового мозку. При цьому поряд із маркерною транслокацією інколи з'являються додаткові перебудови хромосом. Зокрема, поява трисомії 8 часто трапляється як ізольована аномалія de novo при гострій мієлоїдній лейкемії, а при ХМЛ ця аномалія часто асоціюється з іншими хромосомни-

ми перебудовами. Трисомію 8-ї, 19-ї хромосоми, як і появу додаткової делетованої 22-ї хромосоми — так званої філадельфійської хромосоми (extra Ph), пов'язують із вторинними змінами [4—6]. Виявлення в кістковому мозку у Ph-позитивних пацієнтів із ХМЛ ізохромосоми i(17q) має погане прогностичне значення, бо виникнення цієї аномалії супроводжується втратою коротких плечей 17-ї хромосоми, на яких знаходиться ген-супресор p53 [7]. Появу транслокації t(11;17)(q23;q21) поряд з наявністю Ph-хромосоми пов'язують із різким погіршенням стану пацієнтів із ХМЛ та відсутністю у них відповіді на хіміотерапію [8]. Погане прогностичне значення мають перебудови 1-ї хромосоми, такі як t(1;10)(q12-21;q26), t(1;11)(q12-21;p15) der (17)t(1;17)(q12-21;p11). Можливо, що один або ж більше генів, що знаходяться на хромосомі 1q12-21, мають важливе значення при переході в гостру стадію трансформації ХМЛ [9, 10].

В літературі описані три основних варіанти BCR/ABL гена в залежності від довжини послідовностей гена, що кодує P190BCR/ABL, P210BCR/ABL і P230BCR/ABL білки. Ці три основних варіанти асоційовані з різними клінічними типами перебігу лейкемії у людини [11]. Згідно з літературними повідомленнями у пацієнтів з ХМЛ-Н (нейтрофільна форма) із варіантом гена, що кодує білок P230BCR/ABL, захворювання характеризувалось дуже легким перебігом, а саме середнім рівнем нейтрофільного лейкоцитозу, відсутністю чи мінімальною спленомегалією, надлишком попередників мієлоїдних клітин. Цікавим є той факт, що у цих пацієнтів рівень експресії гена, що кодує P230BCR/ABL, завжди є дуже низьким і лише завдяки високочутливим технологіям аналізу його можна виявити. Лише у одного пацієнта із P230 BCR/ABL описано бластну кризу, причому його лейкемічні бласти несли дві копії філадельфійської хромосоми. Найбільш прогностично несприятливим в таких випадках було поєднання додаткової філадельфійської хромосоми з іншими хромосомними аномаліями, причому ці додаткові перебудови, зокрема анеуплоїдія за рахунок 8-ї чи поява i(17q) хромосоми, можуть виступати як самостійна причина виникнення гострої мієлоїдної лейкемії. Дискутабельним є первинність появи у цих випадках додаткових філадельфійських хромосом [12]. Таким чином, прогностичне значення дея-

ких особливостей каріотипу при ХМЛ дискутується. Це стосується також і виникнення гіперплоїдних клонів (із кількістю хромосом >92), а також появи значної кількості клонів 3n (69 хромосом) або 4n (92 хромосоми) (n — гаплоїдний набір хромосом людини; n = 23) [13]. Адже сьогодні в онкоцитогенетиці приділяють важливу увагу не тільки вивченню постійних хромосомних аномалій, але й появі таких змін каріотипу, які з'являються лише в частині метафаз. З цієї точки зору важливим є дослідження прогностичного значення поєднання певних аномалій, вивчення співвідношень мозаїчних каріотипів, а також інших явищ, які можуть супроводжувати зміни каріотипу.

Матеріали та методи. Всього провели 49 цитогенетичних досліджень аспірату кісткового мозку, отриманого в результаті стерильної пункції від 35 пацієнтів (8 хворих обстежено в динаміці двічі і 3 хворих — тричі). Отримання препаратів метафазних хромосом із аспірату кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ проводили застосовуючи стандартний метод із власною модифікацією [14]. З пунктату кісткового мозку готували гепаринізовану суспензію клітин, які культивували протягом 48 год у середовищі Ігла з подвійним набором амінокислот. Для фіксації клітин використовували суміш етилового спирту і льодяної оцтової кислоти. Аналіз препаратів здійснювали за допомогою G-методу диференціального забарвлення з використанням барвника Гімзи, фосфатного буфера та розчину трипсину. Для постановки діагнозу підраховували 20—40 метафазних пластинок від кожного індивіда.

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті цитогенетичного аналізу аспірату кісткового мозку Ph-позитивних (Ph+) пацієнтів було виявлено додаткові хромосомні перебудови, що становили 25,07 % всіх випадків. Приблизно 80 % аномалій виникало на стадії бластної кризи. Вікова медіана пацієнтів становила 30,5 років. Більшість з них — мешканці Західного регіону України, в основному Львівської області та решти семи областей (85 %), а також пацієнти з Одеської області та Автономної республіки Крим (15 %). Результати дослідження спектра, співвідношення аномалій хромосом та різних типів плоїдності у кістковому мозку «Ph-позитивних» пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією показали, що поряд із присутністю в

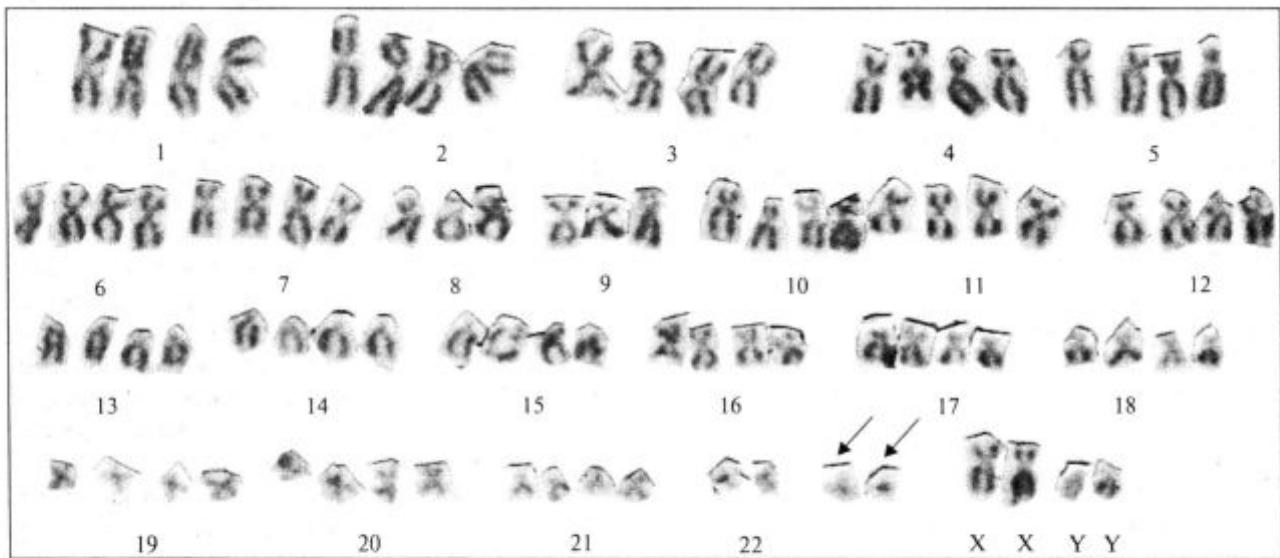
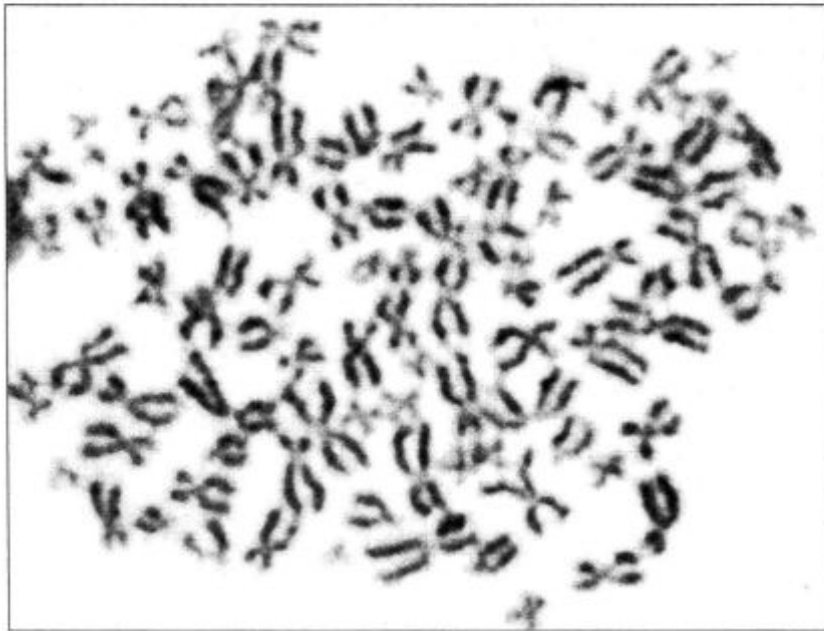


Рис. 1. Каріотип 90,XXYY,Ph+,Ph+,-8,-9 пацієнта із ХМЛ (хронічна стадія захворювання). Стрілками вказані філадельфійські хромосоми

каріотипі пацієнтів із ХМЛ філадельфійської хромосоми спостерігаються додаткові хромосомні аномалії, які були представлені анеуплоїдними наборами, делеціями хромосом та ізохромосомами, появою клонів клітин із підвищеною поліплоїдністю наборів хромосом (із різною кількістю гаплоїдних наборів n). Серед всіх аномалій анеуплоїдії, а саме трисомії хромосом, складала 11,11 %; делеції становили стільки ж, ізохромосоми — $i(17q)$ — 2,85 %. Делеції були

представлені додатковою філадельфійською хромосомою — $del(22)(q11.2)$ та $del(9q)$. Згідно із літературними повідомленнями, інтерстиціальну та термінальну делецію довгих плечей 9-ї хромосоми виявляють як при ХМЛ, так і при гострій мієлоїдній лейкемії [15].

У 33,3 % усіх випадків були виявлені поряд з метафазами із гаплоїдним набором $2n$ поліплоїдні набори хромосом $3n$ і $4n$ з різним співвідношенням клонів клітин, а у 12,5 % випадків —

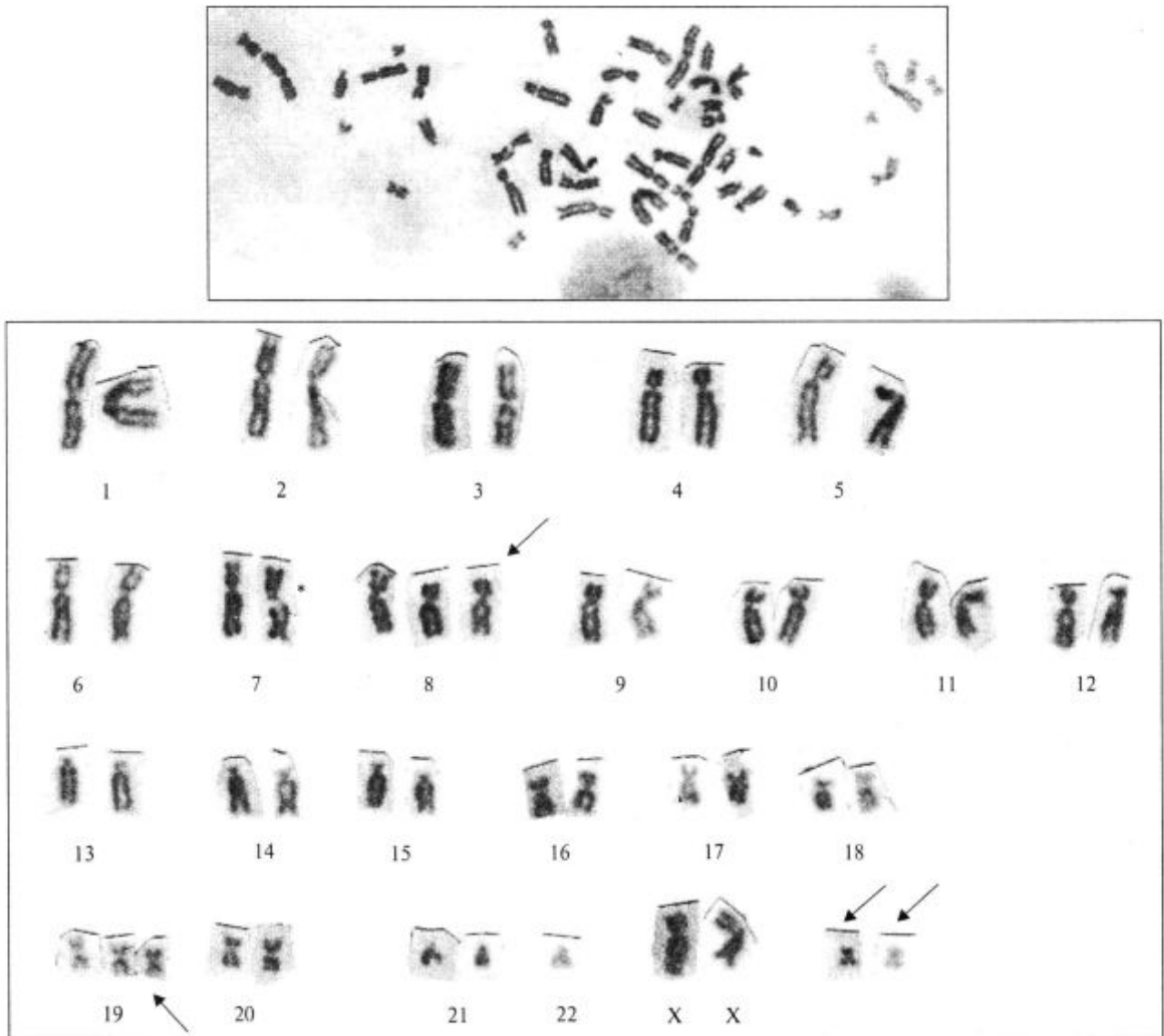


Рис. 2. Каріотип 49, XX, Rh+, +8, +19, +extra Ph пацієнтки з ХМЛ (БК). Стрілками вказано додаткові копії хромосом та філадельфійські хромосоми. * Місце розриву хромосоми

більше 4n. Негативне прогностичне значення відзначали при частоті поліплоїдів 20 % і більше від загальної кількості метафазних пластинок. Поява одиничних гіперплоїдів з більшою, ніж 4n плоїдністю, мала негативне прогностичне значення лише у випадку поєднання геномної мутації із додатковою аномалією хромосом. При виявленні біятетраплоїдних клонів клітин з кількістю хромосом <92 в хронічній стадії захворювання спостерігали погіршення стану. На рис. 1 представлений біятетраплоїдний каріотип з 90 хромосомами і двома філадельфійськими хромосома-

ми. В цьому випадку втрачалися хромосоми 8 і 9.

У 14,5 % обстежених пацієнтів були присутні одиничні метафази зі значним ступенем фрагментації всіх чи частини хромосом до розпилення їх на дрібні хромосомні ділянки — явище пульверизації (розпилення) хромосом. Згідно із літературними повідомленнями, аналогічні зміни спостерігали при дії на хромосоми онкогенних і неонкогенних вірусів, що зумовлюють прогресивно наростаюче пошкодження хромосом, яке виражається в численних розривах по довжині і закінчується повним розпадом на

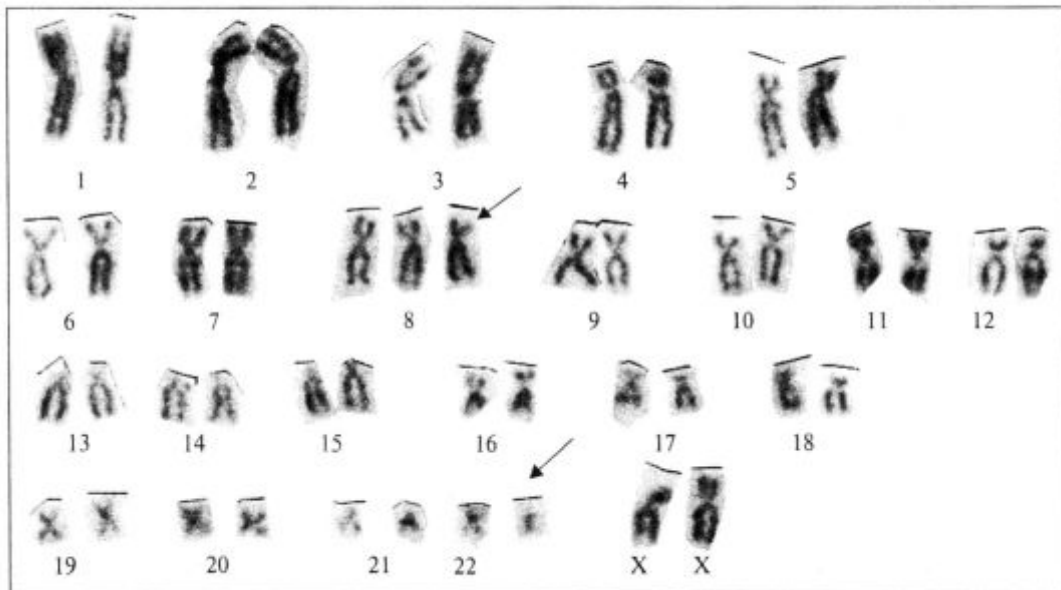


Рис. 3. Каріотип 47,XX, Rh+, +8 пацієнтки з ХМЛ (БК). Стрілками вказано додаткову копію хромосоми та філадельфійську хромосому

дрібні фрагменти (пудверизація). Явище вперше описане ще в 60-х роках в культурах клітин крові при дії вірусів [16]. Поява таких множинних розривів передуює або ж співпадає з процесом морфологічної трансформації культури. Можли-

во, це є результатом дії ізоформ «зліпленого» BCR/ABL білка. Спостерігали також одиничні розриви хромосом — аберації хроматидного та хромосомного типів, причому ламкі сайти співпадали з місцями розміщення онкогенів

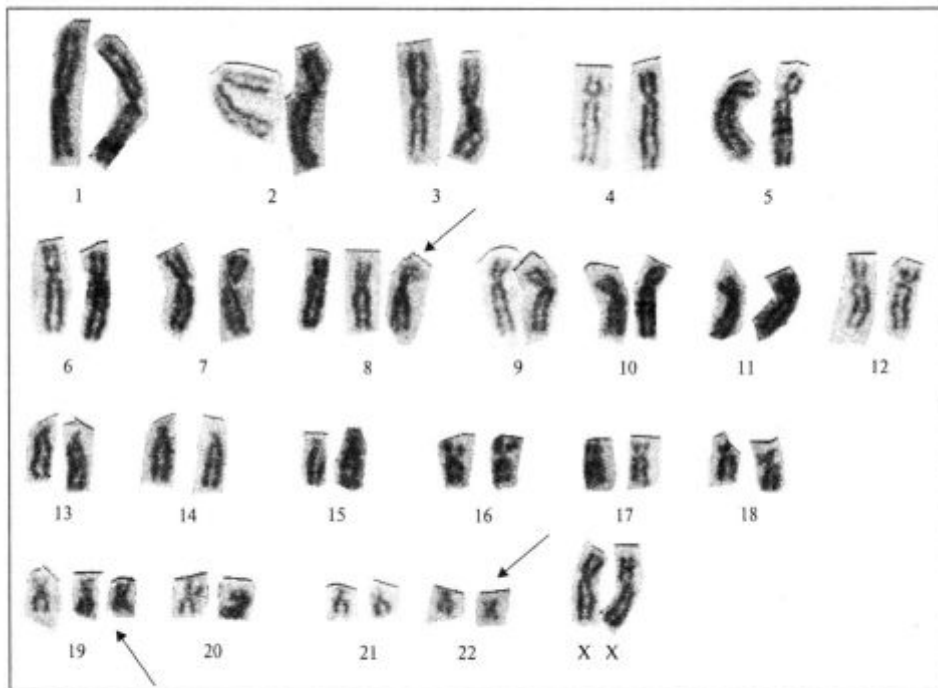
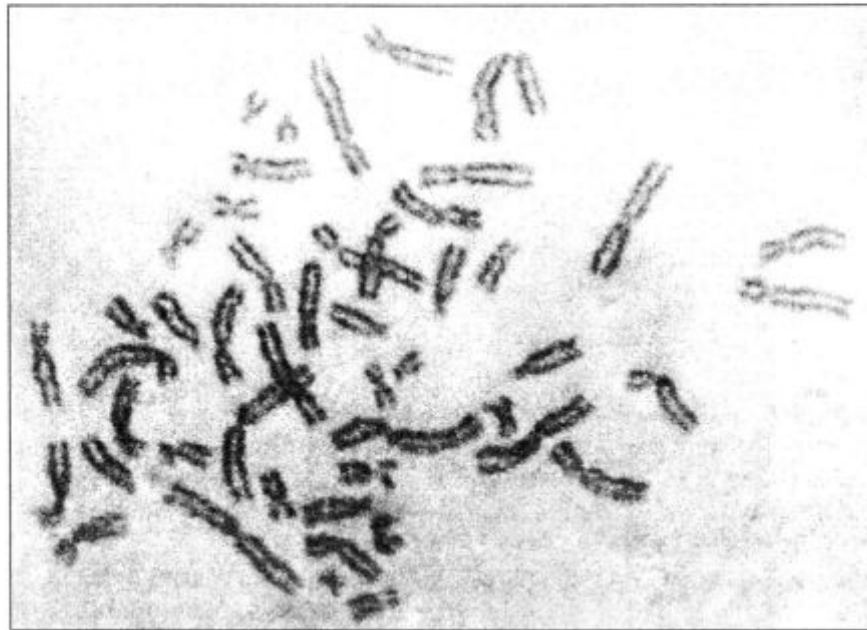


Рис. 4. Каріотип 48, XX, Rh+, +8, +19 пацієнтки з ХМЛ (БК). Стрілками вказано додаткові копії хромосом та філадельфійську хромосому

(рис. 2). Так, делеція ділянки 7q22 трапляється при гострій мієлоїдній лейкемії [17, 18]. Найчастіше пошкодження хромосом спостерігали в районах 3p21, 5q12-13, 7q22, 9q22 та 22q12.

В хронічній стадії захворювання транслокація t(9;22) була найчастішою аномалією. Як прави-

ло, у первинних пацієнтів кількість метафаз із Rh+ хромосою коливалась від 90 до 100 %. Поряд із Rh-хромосою на хронічній стадії захворювання виявили додаткову аномалію — делецію довгих плечей 9-ї хромосоми, поліплоїдні клони клітин та мікрохромосоми. У пацієнтки з

Спектр додаткових хромосомних аномалій у Ph-позитивних пацієнтів із extra Ph-хромосомою del(22)(q11.2) на стадії бластної кризи

№ п.п	Вік (роки)/ стать	Спектр хромосомних аномалій	Співвідношення різних клонів клітин, %	Виживання
1	55/ж	47,XX,+del(22)(q11.2)/94,XXXX,+del(22)(q11.2)	75/25	Померла
2	30/ч	47,XX+del(22)(q11.2)/48,XX,+del(22)(q11.2),+8	70/30	Помер
3	23/ж	49,XX,+del(22)(q11.2),+8+19/48,XX,+8,+19// 47,XX+del(22)(q11.2)/ 47,XX,+8/	75/10/5/5	Погіршення стану: анемія, наростаюча бластемія

делецією довгих плечей 9-ї хромосоми (20 % клонів — при першому каріотипуванні і 5 % — у динаміці досліджень) спостерігалась клінічна ремісія. Негативне прогностичне значення мала підвищена частота мікрохромосом та поліплоїдних наборів хромосом (20 % і більше) з кількістю наборів 3n чи 4n.

Найхарактернішою додатковою аномалією хромосом поряд з маркерною філадельфійською транслокацією у пацієнтів з ХМЛ була поява extra Ph-хромосоми. Дану додаткову делетовану 22-у хромосому спостерігали на стадії бластної кризи в поєднанні з іншими хромосомними аномаліями. Результати поєднання extra Ph з іншими аномаліями на стадії бластної кризи у пацієнтів з ХМЛ та зв'язок із виживанням свідчать про погане прогностичне значення додаткової філадельфійської хромосоми, яка часто супроводжувала інші хромосомні аномалії (таблиця). У випадку 1 поряд із додатковою основною перебудовою у кістковому мозку пацієнтки виявляли клони клітин із підвищеною плоідністю хромосом, а саме варіанти 3n і 4n, гіперплоїд із 140 хромосомами та мікрохромосоми. Хвора померла. У випадку 2 у хворого поряд з основним клоном клітин (із extra Ph-хромосомою) був присутній додатковий клон, із надлишковою копією 8-ї хромосоми у 30 % метафаз. Хворий помер. У випадку 3 спостерігали різні варіанти поєднання extra Ph-хромосоми із надлишковими 8-ю та 19-ю хромосомами. Хвора перебуває у важкому стані. Співвідношення клонів клітин з різною кількістю хромосом представлено у таблиці. У цьому випадку домінували клони клітин із 49 хромосомами (75 %). Частою була і комбінація клонів клітин із кількістю хромосом 48,XX з трисомією 8-ї і 19-ї хромосом (10 %). Таким чином, для даного випадку була характерна полі-

клоновість, представлена чотирма різними клонами клітин. Згідно з літературними повідомленнями появу трисомії 8-ї та 19-ї хромосом спостерігають при вторинних змінах [19—21].

На рис. 2—4 представлено різноманіття клонів клітин в аспіраті кісткового мозку у хворих ХМЛ на стадії бластної кризи.

Отже, негативне прогностичне значення мала поява extra Ph-хромосоми, а також її поєднання з іншими аномаліями — трисомією 8-ї та 19-ї хромосом, поліплоїдією та пульверизацією хромосом.

Висновки. Таким чином, в термінальній стадії хронічної мієлоїдної лейкемії спостерігається перехід із раніше моноклонової пухлини в поліклонову зі всіма властивими їй закономірностями пухлинної прогресії. Також підвищується рівень мутації в клітинах, що створює клональну різноманітність. Отже, в перебігу ХМЛ можна виділити три основних мутаційних етапи. Перший етап може бути зумовлений делецією довгого плеча 22-ї хромосоми внаслідок розривів bcr-гена в певних ламких ділянках — M-bcr та m-bcr. Розриви в ділянці M-bcr спостерігаються майже в 95 % випадків. При розривах bcr-гена в μ -bcr ділянці припускається можливість появи додаткової філадельфійської хромосоми як вторинної перебудови, де первинною може бути трисомія 8. Другий етап веде до порушення гіпотетичного механізму, що визначає стабільність хромосомного набору, яка зберігалась на всьому перебігу хвороби аж до бластної кризи. Третій етап характеризується появою наростаючої кількості повторних мутацій, утворенням поліклонової множинної злякисної пухлини (до 4—5 різних клонів клітин).

SUMMARY. We studied the prognostic significance of combination of different chromosomal abnormalities and genomic mutations in Ph⁺ chronic myeloid leukemia patients. In gen-

eral 49 cytogenetic analyses of bone marrow aspirate from 35 patients (11 of these observed in dynamics) have been carried out. The additional chromosome changes were found in 25,07 % cases and approximately 80 % of anomalies appeared in the blast phase. Among the secondary chromosomal abnormalities extra Ph-chromosome appeared mostly in different combinations with trisomy of chromosomes 8 and 19. Appearance of clonal differences of cells, high rate of genome mutations and of microchromosomes had negative prognostic significance on disease proceeding.

РЕЗЮМЕ. Изучалось прогностическое значение сочетания разных хромосомных аномалий, а также геномных мутаций у Ph⁺-пациентов с хронической миелоидной лейкемией. Проведено 49 цитогенетических исследований аспирата костного мозга от 35 пациентов (11 обследовано в динамике). Добавочные аномалии хромосом выявлены в 25,07 % случаев, причем приблизительно 80 % аномалий появлялись на стадии бластного кризиса (БК). Для стадии БК характерной добавочной аномалией хромосом была extra Ph-хромосома, трисомия 8-й и 19-й хромосом. Негативное прогностическое влияние на протекание ХМЛ имело появление клонального разнообразия клеток, повышенной частоты геномных мутаций и микрохромосом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Виговська Я.І., Новак В.Л.* Стандарти в гематології. — Л.: ПП «Кварт», 2002. — 164 с.
2. *Показники діяльності гематологічної служби України в 1999 р.* — Київ: МОЗ України, 2000.
3. *Чехун В.Ф.* Шляхи та перспективи розвитку експериментальної онкології в Україні. — Київ: ДІА, 2001. — 253 с.
4. *Cannistra S.A.* Chronic myelogenous leukemia as a model for the genetic basis of cancer // *Hematol. Oncol. Clin. North. Amer.* — 1990. — № 4(2). — P. 337–357.
5. *Anastasi J., Fend J., Le Beau M.M., Larson R.A. et al.* The relationship between secondary chromosomal abnormalities and blast transformation in chronic myelogenous leukemia // *Leukemia.* — 1995. — № 9(4). — P. 628–663.
6. *Johansson B., Fioretos T., Mitelman F.* Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia // *Acta Haematol.* — 2002. — 107(2). — P. 76–94.
7. *Chang F., Syrjanen S., Tervahauta A., Syrjanen K.* Tumorigenesis associated with the p53 tumor suppressor gene // *Brit. J. Cancer.* — 1993. — 68, № 4. — P. 653–661.
8. *Nishii K., Usui E., Sakakura M., Miyata E. et al.* Additional t(11;17)(q23;q21) in patient with Philadelphia-positive mixed lineage antigen-expressing leukemia // *Cancer Genet Cytogenet.* — 2001. — 126(1). — P. 8–12.
9. *Su X.Y., Cao Q., He K.L.* Chromosomal abnormalities in 38 CML cases of various phases // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* — 1999. — 79(1). — P. 34–37.
10. *Su X.Y., Wong N., Cao Q. et al.* Chromosomal aberrations during progression of chronic myeloid leukemia identified by cytogenetic and molecular cytogenetic tools: implication of 1q12–21 // *Cancer Genet. Cytogenet.* — 1999. — 108(1). — P. 6–12.
11. *Pane F., Intrieri M., Quintarelli C., Izzo B. et al.* BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations // *Oncogene.* — 2002. — 21. — P. 8652–8667.
12. *Paulsson K., Sall T., Fioretos T. et al.* // *Cancer Genet. Cytogenet.* — 2001. — 130. — P. 160–165.
13. *Blood Reviews.* — Harcourt Publ. Ltd., 2001. — 15. — P. 49–59.
14. *Czepulkowski B.H., Bratt R., Rooney D.E.* Basic techniques for the preparation and analysis of chromosomes from bone marrow and leukaemic blood // *Human cytogenetics. Malignancy and acquired abnormalities. A practical approach.* — 1992. — 11. — 26 p.
15. *Vallespi T., Imbert M., Mecucci C. et al.* Diagnosis, classification and cytogenetics of myelodysplastic syndromes // *Haematol.* — 1998. — 83. — P. 258–275.
16. *Прокофьева-Бельговская А.А.* Основы цитогенетики человека. — М.: Медицина, 1969. — 544 с.
17. *Stephenson J., Czepulkowski B., Hirst W., Mufti G.J.* Deletion of acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML) // *Lekemia Res.* — 1996. — 20. — P. 235–241.
18. *Fischer K., Frohling S., Scherer S.W. et al.* Molecular cytogenetic delineation of deletions and translocations involving chromosome band 7q22 in myeloid leukemias // *Blood.* — 1997. — 89. — P. 2036–2041.
19. *Mitelman F.* The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia // *Leuk. Lymphoma.* — 1993. — 11, Suppl 1. — P. 11–15.
20. *Barbouti A., Johansson B., Hoglund M. et al.* Multicolor COBRA-FISH analysis of chronic myeloid leukemia reveals novel cryptic balanced translocations during disease progression // *Genes Chromosom. Cancer.* — 2002. — 35(2). — P. 127–37.
21. *Hagemeijer A.* Chromosome abnormalities in CML // *Baillieres Clin. Haematol.* — 1987. — 1(4). — P. 963–981.

Надійшла 13.05.04