

М.О. Вальчук¹
 В.Ф. Інденко¹
 О.В. Зотова¹
 А.С. Лук'янова¹
 Ю.С. Кароль¹
 І.Й. Євстахевич¹
 Р. Воронська²
 Б. Пеньковська-Греля²
 В.Є. Логінський¹

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

²Онкологічний центр — Інститут ім. М. Склодовської-Кюрі, Варшава, Польща

Ключові слова: лімфоїдні неоплазії, лапароскопічна біопсія, стандартне цитогенетичне дослідження, флуоресцентна *in situ* гібридизація (FISH), хромосомні аберації, діагностика, прогноз.

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ КЛІТИН ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ ЧЕРЕВНОЇ ПОРОЖНИНИ ПРИ ЇХ ЛАПАРОСКОПІЧНІЙ БІОПСІЇ У ХВОРИХ НА ЗЛОЯКІСНІ ЛІМФОМИ

Мета: оцінити придатність пухлинного матеріалу, отриманого при лапароскопічній (відеохірургічній) діагностичній біопсії ізольовано уражених лімфатичних вузлів (ЛВ) черевної порожнини і заочеревинного простору, для цитогенетичного дослідження і визначити його діагностичну цінність. **Методи:** діагностичну біопсію проведено за оригінальною, опрацьованою в ДУ «ІПКТМ НАМН України» методикою, спрямованою на забезпечення легшого доступу до уражених ЛВ та запобігання післяопераційній кровотечі, у 32 хворих. Діагноз лімфоїдної неоплазії (ЛН) на основі гістологічного й імунофенотипічного дослідження біопсійного матеріалу встановлено у 62,5% пацієнтів. Цитогенетичні дослідження (аналіз каріотипу та FISH) клітин ЛВ проведено в 11 хворих на В-клітинні ЛН. **Результати:** виявлено низку хромосомних аберацій: при хронічній лімфоцитарній лейкемії/лімфомі з малих лімфоцитів — $del(11)(q23)$; +8, +12; при фолікулярній лімфомі — $t(2;18;5)(p11;q21;q21)$; при дифузній В-великоклітинній лімфомі — $add(14q)$; $add(6)(p22)$. У FISH-дослідженні визначили делецію гена *ATM* при хронічній лімфоцитарній лейкемії/лімфомі з малих лімфоцитів, реаранжування генів *BCL2* та *IgK* при фолікулярній лімфомі, ампліфікацію генів *IGH*, *BCL6*, *BCL2* при дифузній В-великоклітинній лімфомі. **Висновок:** встановлено доцільність застосування лапароскопічної біопсії при ізольованому ураженні ЛВ черевної порожнини для своєчасної діагностики ЛН.

ВСТУП

Неходжкінські лімфоми (НХЛ) — злоякісні пухлини лімфоїдної тканини, що об'єднують низку лімфопроліферативних процесів різного ступеня злоякісності, характеру, об'єму ураження та особливостей клінічного перебігу. Первинний механізм виникнення НХЛ, очевидно, полягає у пошкодженні генетичного апарату лімфоїдної клітини, зумовленого мутаціями, що призводить до порушення регуляції її клітинного циклу, розладів диференціювання і апоптозу та неконтрольованої проліферації [3, 4].

Сучасний стандарт діагностики НХЛ включає характеристику біологічних властивостей пухлинного субстрату на основі морфологічних, імунофенотипічних, генетичних методів дослідження, оцінки клінічних проявів та поширеності процесу за допомогою інструментальних методів (рентгенологічне, ультрасонографічне дослідження, комп'ютерна томографія тощо) [3, 9, 11]. Сукупність цих методів дозволяє поглибити розуміння патогенезу і біологічної природи лімфоїдних пухлин, розділити їх на окремі категорії за класифікацією пухлин лімфоїдної тканини ВОЗ 2008 р. [26] та індивідуалізувати лікування відповідно до прогностичних факторів ризику.

Пухлинний матеріал для дослідження отримують хірургічним методом — шляхом ексцизійної біопсії пухлинного утворення, найчастіше лімфатичного вузла (ЛВ), оскільки периферична кров і кістковий мозок при НХЛ часто залишаються інтактними [8, 11, 19]. Голкова біопсія у цих хворих малоінформативна, інколи складна для виконання та небезпечна, тому допускається тільки в ургентних ситуаціях [15, 28]. У випадку ізольованого ураження ЛВ грудної клітки, черевної порожнини, заочеревинного простору без периферичної лімфаденопатії хірургічний доступ і наступна біопсія лімфатичного утворення стає травматичною процедурою для хворого. Для діагностики таких ізольованих уражень розробляють і запроваджують міні-інвазивні методи відеохірургії (лапароскопічної діагностики) [14, 15, 18].

Стандартна діагностика варіантів злоякісних лімфом, поряд з морфологічним (гістологічним) та імунофенотипічним (імуногістохімічним) методами, включає цитогенетичне дослідження злоякісних клітин. Одні категорії НХЛ мають специфічні діагностичні хромосомні аберації (цитогенетичні маркери), при інших виявляють часті хромосомні зміни, які дозволяють уточнити варіант НХЛ і визначити його прогноз [5, 16, 22]. У сучасній цитогенетич-

ній діагностиці НХЛ комплексно використовують 2 методи аналізу — стандартне цитогенетичне дослідження з диференційним забарвленням хромосом, при якому аналізують весь каріотип, та метод флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH), при якому проводять прищільний пошук визначених хромосомних порушень [3, 16].

Метою роботи було оцінити придатність пухлинного матеріалу, отриманого при лапароскопічній діагностичній біопсії ізольовано уражених ЛВ черевної порожнини і заочеревинного простору, для цитогенетичного дослідження і визначити його діагностичну цінність.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Протягом 2007–2012 рр. у хірургічній клініці ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» лапароскопічну біопсію ЛВ з приводу ізольованого збільшення ЛВ черевної порожнини та заочеревинного простору без гіперплазії периферичних ЛВ виконано у 32 хворих. Ще у 2 випадках під час діагностичної лапароскопії не вдалося знайти ЛВ, доступних для біопсії. У 31 пацієнта це були первинні діагностичні втручання, оскільки причина внутрішньочеревної лімфаденопатії (ЛАП) невідома. В 1 хворого зі встановленим діагнозом хронічної лімфоцитарної лейкемії (ХЛЛ) біопсію проведено для вчасної діагностики можливого рецидиву (трансформації) неопластичного процесу. Пацієнти дали проінформовану згоду на використання біопсійного матеріалу в дослідницьких цілях.

Лапароскопічну діагностичну біопсію проводили за оригінальною, опрацьованою в інституті методикою, спрямованою на забезпечення легшого доступу до уражених ЛВ та запобігання післяопераційній кровотечі (патент на винахід № 87774) [8]. Післяопераційних ускладнень не було. Отриманий біопсійний матеріал використовували для гістологічного, при необхідності — імунохімічного та цитогенетичного досліджень, що дозволило встановити діагноз у всіх 32 пацієнтів, підданих успішній відеохірургічній діагностичній лімфаденектомії. Встановлені діагнози: підтверджено діагноз ХЛЛ — у 1 хворого, В-клітинна НХЛ (В-НХЛ) — 14, Т-клітинна лімфома — 1, лімфома Ходжкіна — 4, пухлина підшлункової залози з метастатичним ураженням ЛВ — 4, рак жовчного міхура з метастатичним ураженням ЛВ — 2, злоякісна неоплазія яєчника з вторинним пухлинним ураженням великого сальника — 2, поширений карциноматоз очеревини — 1, заочеревинна фіброма — 1, саркоїдоз заочеревинних ЛВ — 1 та туберкульоз ЛВ — у 1 пацієнта. Таким чином, неоплазії лімфоїдної тканини становили 62,5% усіх випадків внутрішньочеревної ЛАП.

В 11 хворих (5 жінок та 6 чоловіків віком від 50 до 90 років, медіана віку — 70 років), у яких на основі результатів гістологічного та імунофенотипічного досліджень встановлено діагноз В-НХЛ,

за допомогою цитогенетичного методу вивчено лапароскопічно отриманий пухлинний матеріал для уточнення категорії лімфоми, передбачення перебігу хвороби та вибору терапії. Розподіл 11 хворих за варіантами В-НХЛ та їхні деякі клінічні дані наведено у табл. 1. Таким чином, цитогенетичні дослідження виконано у 4 хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію/лімфому з малих лімфоцитів (ХЛЛ/ЛМЛ), 1 — на фолікулярну лімфому (ФЛ), 1 — на лімфому маргінальної зони (ЛМЗ), 5 — на дифузну В-великоклітинну лімфому (ДВВКЛ).

Таблиця 1

Клінічні дані обстежених хворих на В-НХЛ

Пацієнт	Вік/стать	Початковий діагноз	Остаточний діагноз	Лікування (кількість курсів ХТ)	Результат лікування
A	58/чоловіки	Прогресія/трансформація ХЛЛ	ХЛЛ	Флударабін + алемтузумаб (5); хлорамбуцил + метилпреднізолон (4)	Резистентність, прогресування, смерть
B	74/жінки	ЛАП/НХЛ?	ХЛЛ/ЛМЛ	Не проводили	Прогресування, смерть
C	60/чоловіки	ЛАП/ДВВКЛ?	ЛМЛ/ХЛЛ	Відмова	Прогресування, смерть
D	58/чоловіки	ЛАП, спленомегалія/ХЛЛ?	ХЛЛ/ЛМЛ	Спленектомія; СОР, СНОР	Часткова ремісія
E	56/чоловіки	ЛАП/НХЛ?	ФЛ	СОР (5)	Часткова ремісія
F	69/чоловіки	ЛАП, спленомегалія, ураження кісткового мозку	ЛМЗ селезинки	Спленектомія; флударабін + циклофосфамід (3)	Часткова ремісія
G	74/чоловіки	ЛАП, спленомегалія	ДВВКЛ	Не проводили	—
H	58/жінки	ЛАП, спленомегалія	ДВВКЛ	СНОР (2), флударабін (1)	Стабільний перебіг
K	53/жінки	ЛАП, ураження головного мозку	ДВВКЛ	СНОР	Прогресування, смерть
L	50/жінки	Ізольована ЛАП	ДВВКЛ	СНОР, етопозид	Стабільний перебіг
M	90/жінки	Ізольована ЛАП	ДВВКЛ	Не проводили	—

Тут і далі: ХТ — хіміотерапія.

Проведено цитогенетичні дослідження метафазних пластинок, отриманих за допомогою прямих препаратів та 72-годинних культур клітин ЛВ. Використовували загальноприйнятий метод культивування клітин ЛВ *in vitro*. Обробку клітин виконували за стандартною методикою, яка включала дію колхіцину, гіпотонізацію, фіксацію і приготування препаратів. Аналіз метафазних хромосом проводили із застосуванням G-методики диференційного забарвлення фарбою Райта [2, 7, 24, 27]. Забарвлені препарати аналізували при збільшенні $\times 1000$ під світловим мікроскопом Olympus BX41 («Olympus», Японія) у лабораторії імуноцитології та генетики пухлин крові ДУ «ІПКТМ НАМН України» з використанням системи для хромосомного аналізу CytoVision («Applied Imaging», Великобританія)

ОРИГИНАЛЬНІ ІССЛЕДОВАНИЯ

та на мікроскопі Axioskop 40 («Carl Zeiss Jena», Німеччина) за допомогою системи для аналізу каріотипу та FISH («MetaSystems», Німеччина) у лабораторії цитогенетики Онкологічного центру — Інституту ім. М. Складовської-Кюрі (Варшава, Польща). При аналізі та описі каріотипу та FISH дотримувалися критеріїв *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* — ISCN, 2009 [20].

У частині випадків мітози були відсутні або ж їх якість незадовільна. За відсутності придатних до аналізу метафазних пластинок у деяких випадках додатково застосовували метод FISH з відповідними мітками: точкова мітка до гена *ATM*, мітки до точки розриву в генах (Break Apart) *c-MYC*, *BCL6*, *BCL2*, *IGK*, транслокаційна мітка Dual Color, Dual Fusion до генів *BCL2* та *IGH* («Vysis», США), а також мітки до цілих хромосом 2 та 5. Усі FISH-дослідження виконані в лабораторії цитогенетики Онкологічного центру — Інституту ім. М. Складовської-Кюрі. Підготовку препаратів та процедуру гібридизації здійснювали за D. Pinkel та співавторами [25] з урахуванням рекомендацій виробника мітки. Аналізували не менше 200 клітин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показанням до проведення лапароскопічної анатомічної та резекційної біопсії у хворих була гіперплазія внутрішньочеревинних та/або заочеревинних ЛВ при відсутності збільшених периферичних ЛВ за умови, що загальноклінічні, біохімічні, спеціальні гематологічні дослідження, ультразвукова діагностика, комп'ютерна та магнітоядерна томографія не дали можливості встановити діагноз. Діагностична лімфаденектомія шляхом відкритого хірургічного втручання за типом лапаротомії, торакотомії є доволі травматичною, супроводжується тривалим післяопераційним періодом, та, найголовніше, відтермінуванням призначення необхідної терапії до часу повного загоєння операційної рани. Запровадження методів відеохірургії для діагностики ізольованих ЛАП дає значний позитивний ефект: мінімальна хірургічна травма, коротка тривалість операції, швидке відновлення пацієнта і, звичайно, можливість відразу після верифікації діагнозу призначити адекватну ХТ [14, 15, 18]. Однак виконання такої порівняно малотравматичної діагностичної процедури часто супроводжується технічними труднощами, підвищеною кровоточивістю, анемією, а може й інтраопераційною кровотечею, що призводить до невдач та вимагає конверсії у 17% випадків [13].

Цитогенетичні дослідження клітин лапароскопічно видалених ЛВ проведено в 11 хворих на В-НХЛ, із них у 6 (55%) випадках отримано метафазні пластинки, придатні для стандартного каріотипічного дослідження, у 6 виконано FISH, причому у 3 хворих одночасно застосовано обидва цитогенетичні методи, а у 2 випадках не вдалося отримати мітозів і не застосовано FISH-методу. Результати цитогенетичних досліджень показано в табл. 2.

Таблиця 2

Результати цитогенетичних досліджень клітин ЛВ хворих на В-НХЛ

Пацієнт	Каріотип	FISH	Діагноз
A	46,XY,del(11)(q23)[15]	nuc ish (<i>ATM</i> ×1) [204/235]	ХЛЛ/ЛМЛ
B	47,XX,+12[4]/48,XX,+8,+12[1]/ 49,XX,inc[1]/50,XX,inc[1]/ 46,XX[13]	Не проведено	ЛМЛ
C	Відсутні метафазні пластинки	nuc ish (<i>MYC</i> ×2) [291/291] nuc ish (<i>BCL6</i> ×2) [233/233]	ЛМЛ/ХЛЛ
D	Відсутні метафазні пластинки	Не проведено	ХЛЛ/ЛМЛ
E	46,XY,t(2;18;5) (p11;q21;q21)[20]/ 46,XY[1]	nuc ish (<i>BCL2</i> ×2) (5' <i>BCL2</i> sep 3' <i>BCL2</i> ×1) [194/261] nuc ish (5' <i>IGK</i> ×3,3' <i>IGK</i> ×2) (5' <i>IGK</i> con 3' <i>IGK</i> ×2)[16]/ (<i>IGK</i> ×2)[10] 46,XY,t(2;18;5) (p11;q21;q21). ish t(2;18;5) (wcp5+,wcp2+; wcp5+,wcp2-; wcp2+,wcp5-)[4]	ФЛ
F	Відсутні метафазні пластинки	Не проведено	ЛМЗ
G	46,XY,add(14q)[19]	nuc ish (<i>BCL2</i> ×2, <i>IGH</i> ×3) [157/209] nuc ish (5' <i>BCL6</i> ×2,3' <i>BCL6</i> ×3) (5' <i>BCL6</i> con 3' <i>BCL6</i> ×2) [165/246]	ДВВКЛ
H	46,XX,add(6)(p22) [14]/46,XX[4]	Не проведено	ДВВКЛ
K	46,XX[20]	Не проведено	ДВВКЛ
L	Відсутні метафазні пластинки	nuc ish (<i>IGH</i> ×2, <i>BCL2</i> ×2~10) [208/208]	ДВВКЛ
M	Відсутні метафазні пластинки	nuc ish (<i>MYC</i> ×2) [222/222] nuc ish (<i>BCL6</i> ×2) [219/219]	ДВВКЛ

Метафазні пластинки знайшли у матеріалі 2 хворих на ХЛЛ/ЛМЛ, у 2 випадках мітозів не виявлено, що пов'язано з низькою мітотичною активністю клітин (див. табл. 1). У хворого А зі швидким збільшенням ЛВ черевної порожнини після доброї відповіді ХЛЛ на лікування флударабіном виявлено у клітинах ЛВ делецію довгого плеча 11-ї хромосоми del(11q) (рис. 1). Внаслідок низької якості хромосом, що часто трапляється у хворих на лімфоїдні неоплазії (ЛН), не вдалося точно встановити точку розриву при del(11q). Тому проведено FISH-дослідження за допомогою точкової мітки до гена *ATM* (локус 11q23). У 87% клітин виявлено 1 сигнал від гена *ATM*, що свідчило про його делецію (рис. 2). Цей результат підтвердив результати морфологічного (НХЛ з малих лімфоцитів з дифузним ростом) та імунохімічного (CD5⁺CD19⁺CD23⁺, CD38⁺ > 30%) дослідження, а саме: збільшення ЛВ черевної порожнини у хворого зумовлено прогресуванням ХЛЛ з прогностично несприятливими ознаками. Надалі у хворого відзначали резистентність до цито-

статичної терапії — 5 курсів лікування комбінацією флударабін + алемтузумаб і 4 курси хлорамбуцилу + метилпреднізолону залишилися без відповіді, хворий помер від прогресування неоплазії.

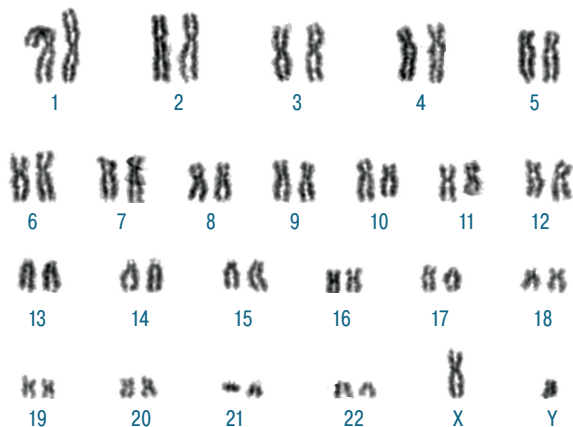


Рис. 1. Хворий А. Каріотип клітин ЛВ: 46,XY,del(11q)

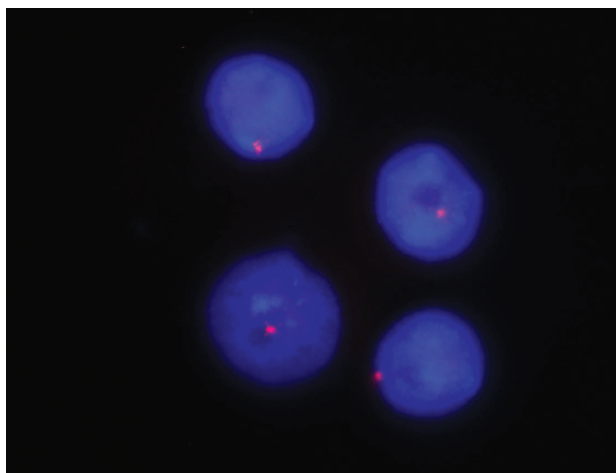


Рис. 2. Хворий А. Результат FISH-аналізу з міткою до гена *ATM*. Наявність одного червоного сигналу свідчить про наявність del(11)(q23)

У клітинах ЛВ хворої В виявлено комплексні перебудови із залученням 12-ї та 8-ї хромосом (рис. 3), що відповідало морфологічному діагнозу ХЛЛ/ЛМЛ. Пацієнтка, діагноз в якій встановлено у термінальній стадії хвороби, невдовзі померла; лікування не проводили.

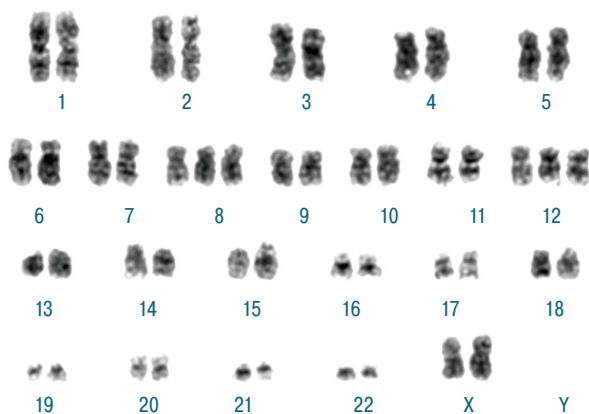


Рис. 3. Хворий В. Каріотип клітин ЛВ: 48,XX,+8,+12

У хворого С з ізольованою ЛАП і підозрою на ДВБКЛ результати морфологічного і цитогенетичного досліджень збіглися. Гістологічно — лімфома зі зрілих лімфоцитів, мітозів у прямих препаратах і культурі клітин лімфовузла не було. FISH-аналіз на інтерфазних ядрах з мітками до точок розриву в генах *BCL6* (локус 3q27) та *c-MYC* (локус 8q24) виявив у всіх клітинах по 2 нерозділені сигнали, що свідчило про відсутність реаранжування цих генів (рис. 4). У перебігу хвороби наступила лейкемізація з появою у крові лімфоцитів фенотипу CD5⁺CD19⁺CD23⁺.

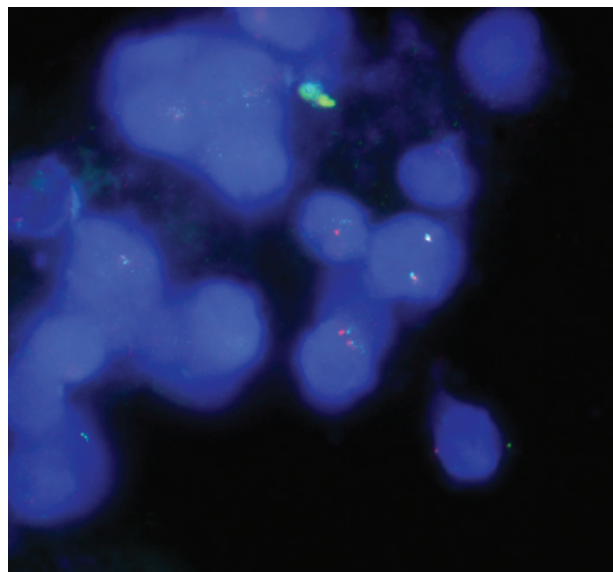


Рис. 4. Хворий D. Результат FISH-аналізу з міткою до гена *c-MYC*. Наявність двох змішаних сигналів свідчить про відсутність реаранжування гена *c-MYC*

У зразку від хворого D не знайдено метафаз та не виконано FISH-дослідження. На основі морфологічного та імунохімічного дослідження встановлено діагноз ХЛЛ/ЛМЛ. Лікування (спленектомія, курси COP, CHOP) привело до часткової ремісії.

У хворого E, гістологічна картина біопсії ЛВ якого відповідала ФЛ, виявлено комплексну транслокацію із залученням 2-ї, 5-ї та 18-ї хромосом (див. табл. 1, рис. 5). Зміна нетипова, але точка розриву характерна для типової ФЛ з t(14;18)(q32;q21), що узгоджується з морфологічним діагнозом. Проведено низку FISH-досліджень для уточнення характеру транслокації з використанням міток до точки розриву в генах *IGK* (локус 2p11) та *BCL2* (локус 18q21) і міток до цілих хромосом 2 та 5. На похідній хромосомі 2 виявлено фрагмент хромосоми 5, на похідній хромосомі 18 — фрагмент хромосоми 2, на похідній хромосомі 5 — фрагмент хромосоми 18 (рис. 6). Дослідження з міткою до гена *IGK* виявило два колокалізаційні сигнали від 5' і 3' фрагментів та додатковий сигнал від 5' фрагмента, що свідчить про реаранжування цього гена. При FISH-аналізі з міткою до гена *BCL2* виявлено розділення одного з сигналів, що свідчить про реаранжування гена *BCL2*. Таким чином, встановлено наявність комплексної транслокації t(2;18;5)(p11;q21;q21). У хворого відзначено добру відповідь на 5 курсів COP.

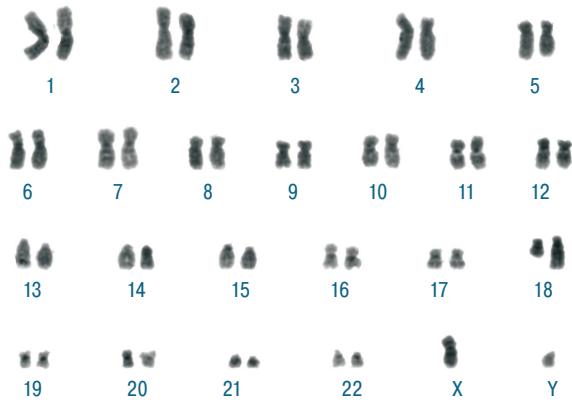


Рис. 5. Хворий Е. Каріотип клітин ЛВ: 46,XY,t(2;18;5)(p11;q21;q21)

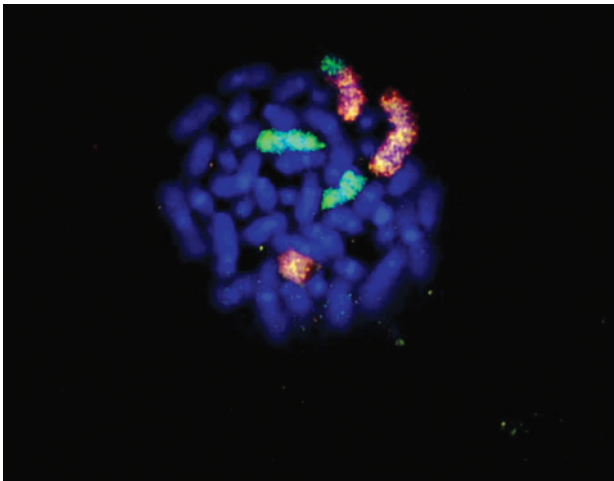


Рис. 6. Хворий Е. Результат FISH-аналізу з мітками до цілих хромосом 2 (червоний флуорохром) та 5 (зелений флуорохром). Виявлено фрагмент хромосоми 5 на похідній хромосоми 2 та фрагмент хромосоми 2 на похідній хромосоми 18

При обстеженні хворого F з внутрішньочеревною ЛАП, значною спленомегалією та наявністю у кістковому мозку близько 5% атипових лімфоїдних клітин на основі гістологічного дослідження внутрішньочеревного ЛВ встановлено діагноз ЛМЗ селезінки з імунофенотипом пухлинних клітин CD5⁻суCD20⁺CD30⁻. У препаратах хворого не було метафазних пластинок внаслідок низької мітотичної активності клітин, FISH не проводили. Пацієнту проведено спленектомію та 3 курси ХТ за схемою FC (флударабін + циклофосфамід), в результаті чого досягнуто ремісії.

Метафазні пластинки, придатні для аналізу, знайшли у препаратах 3 з 5 пацієнтів з морфологічно встановленим діагнозом ДВБКЛ (див. табл. 1). У хворого G виявлено додатковий матеріал на довгому плечі 14-ї хромосоми, партнера транслокації не вдалося визначити. У цього хворого на ДВБКЛ з add(14q) проведено FISH-аналіз із міткою до точки розриву в гені *BCL6* і транслокаційною міткою до генів *IGH* (локус 14q32) та *BCL2* (локус 18q21) для виявлення транслокації t(14;18)(q32;q21). У результаті констатовано збільшення кількості ко-

пій (по 3 копії) гена *IGH* у 75% клітин (рис. 7) та 3' фрагмента гена *BCL6* у 67% клітин, проте без розділення гена *BCL6* (рис. 8). Змішаних сигналів від генів *IGH* і *BCL2* не виявили, що свідчить про відсутність t(14;18).

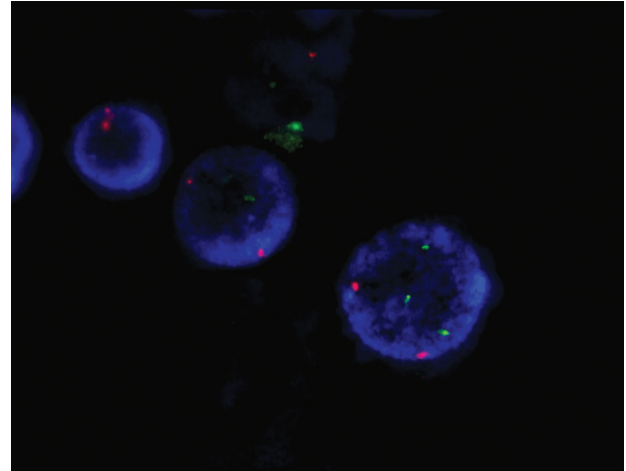


Рис. 7. Хворий G. Результат FISH-аналізу з транслокаційною міткою до генів *IGH* та *BCL2*. Не виявлено змішаного сигналу, характерного для транслокації t(14;18), проте встановлено наявність додаткової копії гена *IGH* (додатковий зелений сигнал) у досліджуваних клітинах

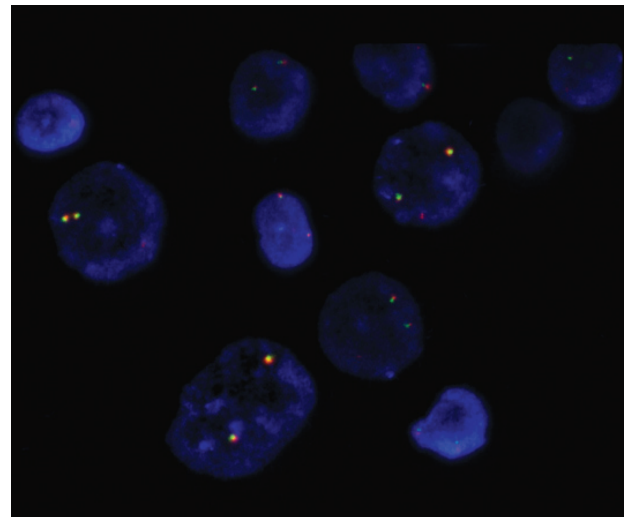


Рис. 8. Хворий G. Результат FISH-аналізу з міткою до гена *BCL6*. Наявність двох змішаних сигналів та одного додаткового червоного свідчить про відсутність реаранжування гена *BCL6* та наявність додаткової копії 3' фрагмента цього гена

У хворої H виявлено 14 метафазних пластинок з додатковим матеріалом невідомого походження на 6-й хромосомі та 4 — з нормальним жіночим каріотипом (рис. 9); FISH-дослідження не проводили. Хвора отримала 2 курси СНОР та 1 флударабіну, що не дало вираженого результату.

У матеріалі хворої K виявлено нормальний жіночий каріотип без цитогенетично видимих змін, що, за даними літератури, свідчить про стабільний перебіг хвороби. Однак за клінічними ознаками у хворої констатували прогресування неопластичного процесу, незважаючи на лікування (2 курси СНОР). Це може бути пов'язано з генними перебудовами, які не-

можливо виявити за допомогою стандартного цитогенетичного методу. FISH-дослідження у цьому випадку не проводили.

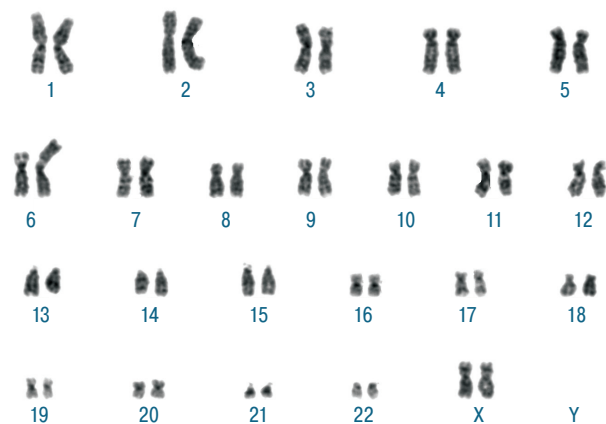


Рис. 9. Хворий Н. Каріотип клітин ЛВ: 46,XX,add(6)(p22)

У матеріалі з ЛВ 2 хворих на ДВБКЛ не знайдено метафаз у зв'язку з низькою мітотичною активністю клітин. У цих хворих провели FISH-аналіз. У *хворої L* використали транслокаційну мітку до генів *IGH* та *BCL2*. Змішаних сигналів від цих генів не було, що свідчить про відсутність t(14;18), проте у всіх клітинах виявлено збільшення кількості копій (від 3 до 10) гена *BCL2* (рис. 10). Пацієнтка отримала курси ХТ СНОР і СНОР + етопозид без помітного клінічного ефекту.

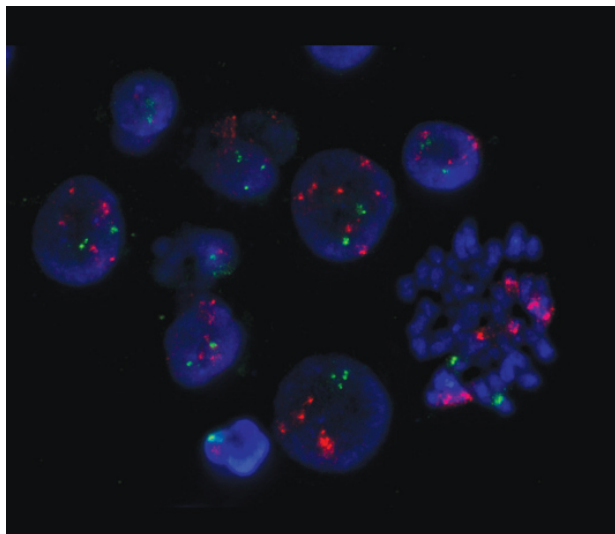


Рис. 10. Хворий L. Результат FISH-аналізу з транслокаційною міткою до генів *IGH* та *BCL2*. Не виявлено змішаного сигналу, характерного для транслокації t(14;18), проте встановлено наявність від 3 до 10 додаткових копій гена *BCL2* (додаткові червоні сигнали) у досліджуваних клітинах

На інтерфазних ядрах у *хворої M* застосовано мітки до точок розриву в генах *BCL6* та *c-MYC*. У цьому випадку у всіх клітинах виявлено по 2 нерозділені сигнали, що вказує на відсутність змін цих генів.

Для ХЛЛ не існує типового цитогенетичного маркера, є низка часто залучуваних перебудов — del(13)(q14), del(11)(q23), del(17)(p13), трисомія 12-ї хромосоми [1, 3, 10]. У доступній літературі представлено аналіз прогностичного значення цих аномалій. Де-

леція del(11)(q23) належить до факторів проміжного прогнозу [16]. Відомо, що в локусі 11q23 міститься ген *ATM*, делеція якого може призвести до синдрому хромосомної нестабільності; при втраті гена *ATM* відбувається прогресивний перебіг ХЛЛ [3, 10, 23]. При цій аберації часто відзначають резистентність до цитостатичної ХТ або короткочасний ефект від лікування. У *хворого А* з такою перебудовою констатували як несприятливий перебіг хвороби (прогресування з масивною внутрішньочеревною ЛАП), так і відсутність відповіді на інтенсивну ХТ. У літературі повідомляють, що саме пухлинна форма ХЛЛ найчастіше характеризується делецією гена *ATM*. Делеція 11-ї хромосоми супроводжується особливим профілем експресії рецепторів адгезії на лейкоцихніх лімфоцитах, що може пояснити їх нагромадження у ЛВ і невеликий лімфоцитоз крові.

Суперечливі погляди існують щодо прогностичного значення трисомії 12-ї хромосоми при ХЛЛ/ЛМЛ. За одними джерелами, при цій аберації характерний стабільний перебіг хвороби, а за іншими — прогресивний [1]. У хворих на ХЛЛ зі швидким прогресуванням найчастіше виявляють такі аберації, як делеція del(17)(p13), трисомія 12-ї хромосоми або дуплікація її довгого плеча та комплексні порушення. Наше спостереження (*хвора В*) свідчить, що трисомія 12-ї хромосоми є прогностично несприятливим фактором перебігу ХЛЛ, особливо за наявності атипової морфології пухлинних лімфоцитів. Натомість делеція del(13)(q14), коли вона є єдиною перебудовою, вказує на сприятливий перебіг хвороби [3, 4, 12].

Для ФЛ характерна транслокація t(14;18)(q32;q21) [3]. Ключовим моментом виникнення цієї лімфоми є перенесення гена *BCL2* з хромосоми 18 на хромосому 14; 2 або 22 (t(14;18)(q32;q21), t(2;18)(p12;q21), t(18;22)(q21;q11)). При цьому ген *BCL2* перебуває під впливом генів важких або легких ланцюгів імуноглобулінів. Стимуляція *BCL2* призводить до гіперекспресії антиапоптотичного білка BCL2, пригнічення апоптозу [3, 17]. При ФЛ та ДВБКЛ зрідка трапляється транслокація t(5;18)(p11;q21), в яку також залучений ген *BCL2* [3]. У *хворого Е* в комплексній транслокації t(2;18;5)(p11;q21;q21) задіяні гени *IGK* (локус 2p11) та *BCL2* (локус 18q21), реаранжування яких підтверджено FISH-дослідженням.

ДВБКЛ не має специфічного генетичного маркера. При цій, гетерогенній за клінічними, морфологічними, імунологічними та генетичними ознаками, групі зрілих ЛН описано низку генетичних аномалій, які включають реаранжування генів важких і легких ланцюгів імуноглобулінів (*IGH*, *IGL*), та соматичні мутації їх варіабельних регіонів, перебудови генів *BCL2* (локус 18q21), *BCL6* (3q27), *TP53* (17p13), *c-MYC* (8q24), *FAS* (10q24) [3, 6, 17, 22, 23]. У літературі намагаються пов'язати цитогенетичні аберації з морфологічними підтипами (центробластна, імунобластна, збагачена Т-клітинами/гістіоцитами та ін.) та варіантами ДВБКЛ за профілем експресії генів (В-клітин гермінальних центрів — germinal center B-cell-like —

GCB, активованих В-клітин — activated B-cell-like — ABC), проте переважно безуспішно. Більше відомо про прогностичне значення генетичних аберацій. Так, найчастіша перебудова $t(14;18)(q32;q21)$ з утворенням химерного гена *IGH/BCL2* характерна для ФЛ, але трапляється у 20–30% хворих на центробластну ДВБКЛ, значно погіршуючи прогноз цього підтипу [3, 17, 22]. Досі відсутні чіткі критерії, крім суб'єктивних морфологічних, які дозволяли б диференціювати ДВБКЛ з цією транслокацією від ФЛ III ступеня з трансформацією у ДВБКЛ. Невідомо, чи відрізняються ці два варіанти за прогнозом [3, 17]. Прогресивний перебіг ДВБКЛ відзначають за наявності великої кількості копій *BCL2* [22, 23]. Ми не виявляли $t(14;18)$ в обстежених хворих на ДВБКЛ, проте наявність ампліфікації гена *BCL2* у хворі L супроводжувалася резистентністю до ХТ.

До інших прогностично несприятливих ознак при ДВБКЛ належить гіперекспресія білка p53, зумовлена порушеннями гена *TP53*. Перебудови за участю 8q24 (*c-MYC*) при ДВБКЛ мають місце рідко і є ознакою вперше виділеної у класифікації ВООЗ 2008 р. нової категорії — некласифікованої В-клітинної лімфоми з ознаками, проміжними між ДВБКЛ і лімфою Беркитта; вони свідчать про дуже агресивний перебіг хвороби [3, 5, 17, 21].

У літературі повідомляють, що у 30–40% хворих на ДВБКЛ ген *BCL6* задіяний у $t(3;14)(q27;q32)$ та інших транслокаціях, а високий рівень експресії білка BCL6 пов'язаний з добрим прогнозом ДВБКЛ [3, 12]. У хворого G виявлено ампліфікацію гена *IGH* та 3' фрагмента гена *BCL6* без розділення гена *BCL6*. Оскільки в цьому випадку не застосовано транслокаційної мітки до генів *BCL6* та *IGH*, не можна точно стверджувати, що додатковий матеріал на 14-й хромосомі $add(14q)$ не зумовлений $t(3;14)$. Перегрупування генних сегментів в локусі *IGH* ($14q32$) може спровокувати утворення генів, які кодують специфічні важкі ланцюги при В-клітинних лімфомах [3, 6, 17]. Прогностичне значення виявлених генетичних порушень у хворого G з'ясувати не вдалося, тому що після лапароскопічної операції він вибув з-під нашого спостереження.

Перебудови у 6-й хромосомі, які виявляли у хворого H, властиві для мієло- та лімфопроліферативних процесів. Зміни в цій хромосомі при НХЛ не мають діагностичного або прогностичного значення і підтверджують лише клональну проліферацію [17].

У багатьох випадках ДВБКЛ наявні комплексні цитогенетичні порушення. У літературі існує думка, що залучення багатьох хромосом у цитогенетичні аберації характерне для несприятливого перебігу неоплазії [22, 23].

У класифікації ВООЗ 2008 р. підкреслюється важливе прогностичне значення стратифікації ДВБКЛ за профілем експресії генів (близько 12 000 генів), який виявляють за допомогою новітніх геномних технологій на основі ДНК і олігонукле-

отидних мікрочипів (microarray) [12]. Він дозволяє чітко виділити підтипи ДВБКЛ з GCB з добрим прогнозом та з постгермінальних ABC з поганим прогнозом. Проте цей поділ наразі не запроваджується у класифікацію лімфом і практику, тому що профілювання експресії генів не стало доступним рутинним діагностичним тестом, а імунохімічні сурогатні маркери (при GCB — експресія CD10 та/або BCL6; при ABC — MUM1/IRF4, Cyclin D) погано корелюють з геномними дослідженнями [21].

Використання стандартного цитогенетичного методу при більшості зрілоклітинних В-НХЛ не завжди буває успішним, оскільки клітини мають низьку мітотичну активність або низьку якість метафазних пластинок [16, 23]. У результаті каріотипування можна виявити як маркерні (специфічні) діагностичні хромосомні порушення, так і варіантні перебудови, які переважно свідчать про несприятливий перебіг хвороби [16, 22]. Перевагою методу FISH є можливість проведення аналізу на інтерфазних ядрах, а також ідентифікації складних хромосомних перебудов та виявлення дрібних (субмікроскопічних) порушень, які неможливо побачити за допомогою стандартного цитогенетичного методу. Крім того, за відсутності свіжого біопсійного матеріалу, FISH може бути виконаний на цитологічних препаратах та гістологічних зрізах з парафінових блоків [3, 22, 25].

ВИСНОВКИ

1. При ізольованому ураженні ЛВ черевної порожнини і заочеревинного простору рекомендовано проводити їх відеохірургічну (лапароскопічну) діагностичну біопсію, яка є малотравматичною і безпечною операцією і дозволяє у 62,5% випадків ізольованої ЛАП діагностувати ЛН.

2. Діагностична лапароскопія дає можливість провести на отриманому біопсійному матеріалі стандартні для ЛН морфологічні, імунохімічні та, зокрема, цитогенетичні дослідження для діагностики типу проліферації, передбачення перебігу та вибору тактики лікування.

3. У результаті проведених цитогенетичних досліджень (аналіз каріотипу та FISH) клітин ЛВ у хворих на В-клітинні ЛН виявлено низку хромосомних аберацій: при ХЛЛ/ЛМЛ — $del(11)(q23)$; +8, +12; при ФЛ — $t(2;18;5)(p11;q21;q21)$; при ДВБКЛ — $add(14q)$; $add(6)(p22)$. У FISH-дослідженні виявляли делецію гена *ATM* при ХЛЛ/ЛМЛ, реаранжування генів *BCL2* та *IGK* — при ФЛ, ампліфікацію генів *IGH*, *BCL6*, *BCL2* — при ДВБКЛ.

4. Результати цитогенетичних досліджень, отриманих при діагностичній лапароскопії ЛВ, мають важливе клінічне (діагностичне та/або прогностичне) значення для ЛН.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Абраменко ИВ, Крячок ИА. Иммунофенотипические и молекулярно-генетические особенности опухолевых клеток

при В-клеточном хроническом лимфолейкозе как факторы прогноза заболевания. Укр мед часопис 2003; **38** (6): 38–44.

2. Андреева СВ, Дроздова ВД. Стандарты анализу препаратів хромосом при неоплазиях кровотоворення (методичні рекомендації). Київ, 2007. 44 с.

3. Атлас: опухоли лимфатической системы/Под ред.: АИ Воробьева, АМ Кременецкой/ Москва: Ньюдиамед, 2007. 294 с.

4. Бялик ТЕ, Гривцова ЛЮ, Карселадзе АИ и др. Некоторые прогностические факторы при современной терапии хронического лимфолейкоза. Современная онкология 2006; **8** (4) (http://www.consilium-medicum.com/media/onkology/06_04/16.shtml).

5. Глузман ДФ, Скляренко ЛМ, Надгорная ВА и др. Новая классификация опухолей лимфоидной ткани (ВОЗ, 2008). Киев: ДИА, 2009. 36 с.

6. Домрачева ЕВ, Асеева ЕА. Возможности и перспективы гематологической цитогенетики. Мед генетика 2004; **3** (4): 166–79.

7. Зерова-Любимова ТЕ, Горovenko НГ. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини (методичні рекомендації). Київ, 2003. 24 с.

8. Інденко ВФ, Євстахевич ІЙ, Інденко ФП та ін. Спосіб відеохірургічної діагностичної резекції хворобливо збільшених заочеревинних лімфатичних вузлів. Патент на винахід 87774, МПК (2009) А61В 17/22, А61В 17/34, А61В 17/313. № а 2008 02482; Заявл. 26.02.2008; Опубл. 10.08.2009. Бюл. № 15.

9. Логінський ВС, Лебедь ГБ. Сучасні принципи діагностики пухлин із зрілих лімфоїдних пухлин. Лаб діагностика 2003; **3**: 48–54.

10. Рукавицын ОА, Поп ВП. Хронические лейкозы. Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2004. 240 с.

11. Чума ВБ. Діагностика лімфаденопатій. Львів: Афіша, 2005. 387 с.

12. Alisadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000; **403**: 503–11.

13. Asoglu O, Porter L, Donohue JH, Cha SS. Laparoscopy for the definitive diagnosis of intra-abdominal lymphoma. Mayo Clin Proc 2005; **80** (5): 625–31.

14. Casaccia M, Torelli P, Cavaliere D, et al. Laparoscopic lymph nod biopsy in intra-abdominal lymphoma: high diagnostic accuracy achieved with a minimally invasive procedure. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech 2007; **17**(3): 175–8.

15. Cavaliere D, Torelli P, Casaccia M, et al. Role of laparoscopic biopsy in the management of intra-abdominal lymphadenopathy. Chir Ital 2003; **55** (4): 511–7.

16. Cmunt M, Michalova K, Karban J, et al. Lymphocyte immunophenotyping and cytogenetics for more precise prognosis in patients with type B chronic lymphocytic leukemia. Cas Lek Ces 2003; **142**: 106–111.

17. Cuneo A. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. 2000; 11–18 (<http://www.infobiogen.fr/services/chromocancer/>).

18. Donohue J, Asoglu O, Porter L, et al. Laparoscopy is the best method to diagnose intraabdominal lymphoma. Ann Surg Oncol 2004; **11** (2): 1068–72.

19. Fior R, Vons C. When should peripheral lymphadenopathy be biopsed. J Chir (Paris) 2003; **140** (5): 291–294.

20. ISCN 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature / LS Shaffer, ML Slovak, LJ Campbell (eds)/ Basel: Karger, 2009. 138 p.

21. Jaffe ES. The WHO classification of lymphomas: Implication for clinical practice and translation research. Hematology: ASH education book 2009; **1**: 523–31.

22. Mioduszewska O, Rymkiewicz G, Pieńkowska-Grela B, Maryniak R. Zalecenia i organizacja diagnostyki patologicznej chłoniaków. Warszawa: PGBC 2006; 3–13.

23. Pieńkowska-Grela B. Aplikacje kliniczne badan cytogenetycznych w zlosliwych chłoniakach niezziarnicznych. Nowotwory. J Oncol 2003; **53** (1): 58–67.

24. Pieńkowska-Grela B, Brycz-Witkowska J, Chmarzyńska-Mróz E, et al. Analiza cytogenetyczna w nowotworach hematologicznych (poradnik). Warszawa: Centrum Onkologii, 2004. 59 p.

25. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Nat Acad Sci USA 1995; **83**: 2934–8.

26. Swerdlow SH, Campo E, Harris HL, et al. WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues (4th edn.). Lyon, France: IARC Press; 2008. 439 p.

27. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual/MJ Barch, T Knutsen, JL Spurbeck (eds)/ 3rd ed. Lippincott-Raven, 1997. 668 p.

28. Yasuda I, Tsurumi H, Omar S, et al. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy for limfadenopathy of unknown origin. Endoscopy 2006; **38** (9): 919–24.

CYTOGENETIC INVESTIGATION OF ABDOMINAL LYMPH NODE CELLS OBTAINED BY LAPAROSCOPIC BIOPSY IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMA

M.O. Valchuk, V.F. Indenko, O.V. Zotova, A.S. Lukyanova, Y.S. Karol, I.Y. Yevstakhevych, R. Woroniecka, B. Pieńkowska-Grela, V.E. Loginsky

Summary. *Aim:* to evaluate the usefulness of tumor material obtained under laparoscopic diagnostic biopsy isolation of affected lymph nodes (LN) of the abdominal cavity and retroperitoneal space for cytogenetic analysis and to determine its diagnostic value. **Methods:** laparoscopic (videosurgical) diagnostic biopsy of the isolated abdominal and retroperitoneal LN was performed in 32 patients. The diagnosis of lymphoid neoplasm based on histopathological and immunohistochemical investigations of the biopsy tissue was established in 62,5% of patients. Cytogenetic investigations (karyotype analysis and FISH) of LN cells were performed in 11 patients with B-cell lymphoid neoplasm. **Results:** a wide spectrum of chromosomal aberrations was identified: in CLL/SLL — del(11)(q23); +8, +12; in FL — t(2;18;5)(p12; q21; q26); in DLBCL — add(14q); add(6)(p22). By FISH method the following aberrations were revealed: the deletion of ATM gene in CLL/SLL, the rearrangement of genes BCL2 and IgK in FL, the amplification of genes IGH, BCL6, BCL2 in DLBCL. **Conclusion:** the expediency of laparoscopic biopsy in isolated abdominal LN impairment was proved for the timely diagnosis of lymphoid neoplasm.

Key words: lymphoid neoplasms, laparoscopic biopsy, standard cytogenetic investigation, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), chromosomal aberrations, diagnostics, prognosis.

Адреса для листування:

Лук'янова А.С.

79044, Львів, вул. Генерала Чупринки, 45

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної

медицини НАМН України»

E-mail: anna.myshka@gmail.com

Одержано: 26.03.2013