

Оригінальні праці

УДК: 616.155.392.8-616.155.392-036.11:612

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЇ ГІБРИДИЗАЦІЇ *IN SITU* ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВТОРИННОГО МІЄЛОФІБРОЗУ

Р.Ю. Лозинський¹, Ю.В. Гонтар², З.В. Масляк¹

¹ ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України" (керівник - проф. В.Л. Новак), м. Львів
Відділення гематології із лабораторною групою (зав. - д.мед.н. З.В. Масляк)

² Медичний центр "ІГР" (керівник - к.мед.н. І.С. Ільїн), м. Київ
Діагностична лабораторія (зав. - Ю.В. Гонтар)

Реферат

Мета. Виявити несприятливі прогностичні маркери та підвищити чутливість генетичної діагностики при вторинному мієлофіброзі.

Матеріал і методи. Проведено обстеження 7 хворих (5 жінок і 2 чоловіків) на вторинний мієлофіброз: з них у 6 осіб мієлофіброз розвинувся внаслідок трансформації справжньої поліцитемії, а у 1 хворої - есенціальної тромбоцитемії. Проводилися загальноклінічні обстеження, цитогенетичне дослідження кісткового мозку зі застосуванням стандартних методів та венозної крові - за авторським методом із використанням гранулоцитного колонієстимулюючого фактора, а також дослідження венозної крові та кісткового мозку методом флуоресцентної гібридизації *in situ*.

Результати й обговорення. Подано клінічну характеристику хворих з вторинним мієлофіброзом, який розвинувся внаслідок трансформації справжньої поліцитемії та есенціальної тромбоцитемії. У 2 хворих виявлено несприятливі цитогенетичні аномалії, такі як моносомія 7-ої хромосоми, комплексний каріотип. Описано випадок хворої на вторинний мієлофіброз, у якої дані цитогенетичного дослідження метафазних хромосом, забарвлених за G-методом, були верифіковані й уточнені методом флуоресцентної гібридизації *in situ*.

Висновок. Застосування цитогенетичного дослідження венозної крові поряд із дослідженням кісткового мозку дозволило полегшити аналіз каріотипу хворих на вторинний мієлофіброз. Виявлення цитогенетичних аномалій допомагає вірогідно виключити наявність хворого вторинного мієлофіброзу без специфічного ураження мієлоїдних кровотворних клітин. Використання методу флуоресцентної гібридизації *in situ* дозволило збільшити чутливість цитогенетичного дослідження, підтвердити наявність сумнівних аномалій у випадку недостатньо якісних препаратів метафазних хромосом, забарвлених за G-методом, ефективніше виявляти та підтверджувати гетерогенність патологічних клонів клітин.

Ключові слова: вторинний мієлофіброз, каріотип, FISH, G-KCF

Abstract

APPLICATION OF FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION FOR DIAGNOSIS OF SECONDARY MYELOFIBROSIS

R. Y. LOZYNSKYI¹, U. V. GONTAR², Z. V. MASLYAK¹

¹ SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine", Lviv, Ukraine

² "IGR" Medical Center, Kyiv, Ukraine

Aim. To identify adverse prognostic markers and to increase sensitivity of genetic diagnostics of secondary myelofibrosis.

Material and Methods. A total of 7 patients (5 females and 2 males) with secondary myelofibrosis were examined. In 6 patients myelofibrosis developed as a result of transformation of polycythemia vera, and in 1 patient myelofibrosis transformed from essential thrombocytemia. Routine clinical examination and cytogenetic studies of bone marrow by standard methods were performed, as well as cytogenetic studies of venous blood by the new method using granulocyte colony stimulating factor and study of peripheral blood and bone marrow by fluorescent *in situ* hybridization method.

Results and Discussion. Clinical characteristics of patients with secondary myelofibrosis as a result of the transformation of polycythemia vera and essential thrombocytemia were outlined. Adverse cytogenetic abnormalities in 2 patients, such as monosomy of chromosome 7 and the complex karyotype were revealed. Case report about the patient with secondary myelofibrosis with data of cytogenetic analysis of metaphase chromosomes stained by G-method verified and refined by fluorescent *in situ* hybridization method is included.

Conclusions. The use of venous blood cytogenetic studies along with bone marrow studies allowed to facilitate karyotype analysis for patients with secondary myelofibrosis. Detection of cytogenetic abnormalities is helpful for reliable exclusion of myelofibrosis genesis from other sources than hemopoietic myeloid cells. The use of fluorescent *in situ* hybridization method increased the sensitivity of cytogenetic study, confirmed the presence of suspicious abnormalities in case of metaphase chromosomes samples of insufficient quality stained by G-method, and detected and confirmed more effectively the heterogeneity of pathological cell clones.

Keywords: secondary myelofibrosis, karyotype, FISH, G-CSF

Вступ

Вторинний мієлофіброз (ВМ) часто виявляють в клінічній практиці як ускладнення онкологічних захворювань з метастазуванням у кістковий мозок (КМ), захворювань сполучної тканини та інфекційної патології. Однак, при трансформації мієлопроліферативних захворювань, таких як справжня поліцитемія (СП) або есенціальна

тромбоцитемія (ЕТ), даний патологічний стан має відмінну природу, оскільки розвивається за рахунок наростання пошкоджень генетичного матеріалу мієлоїдних кровотворних клітин [1]. У цьому випадку хвороба прогресує внаслідок впливу мутацій онкогенів. Клінічна картина при такому варіанті ВМ нагадує ідіопатичний мієлофіброз (D47.1), тому лікування хворих з трансформацією СП та ЕТ у ВМ є ідентичним до терапії ідіопатичного мієлофіброзу [2]. Таким чином, важливою є диференційна діагностика, оскільки ВМ, який не пов'язаний із мієлопроліферативним захворюванням в анамнезі, потребує принципово інших підходів до лікування.

Частота СП та ЕТ в загальній популяції є досить низькою, а трансформація у ВМ відбувається не у всіх хворих [3]. Однак, даний патологічний стан є практично невиліковним. Розроблено міжнародну динамічну прогностичну систему (DIPSS та її вдосконалений сучасний варіант DIPSS Plus із врахуванням даних цитогенетичного аналізу), за допомогою якої можна передбачити перебіг захворювання і рекомендувати хворому аlogenну трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин. Без використання цього методу лікування медіана виживання хворих становить близько 2 років у групі високого ризику [4,5]. Проте, дана процедура недоступна для переважної більшості хворих через відсутність сумісних донорів, високу вартість та значний ризик для життя від власне лікування [6]. Хворі, яким не вдається провести трансплантацію отримують лише паліативну терапію цитостатичними препаратами або радіотерапію [2,6]. Таким чином, дослідження генетичних особливостей ВМ, який виникає внаслідок трансформації СП або ЕТ має значний клінічний інтерес.

Метою дослідження було виявлення несприятливих прогностичних маркерів та підвищення чутливості генетичної діагностики при вторинному мієлофіброзі.

Матеріал і методи

Проведено обстеження 7 хворих (5 жінок і 2 чоловіків) на вторинний МФ: з них у 6 осіб мієлофіброз розвинувся внаслідок трансформації справжньої поліцитемії, а у 1 хворої - есенціальної тромбоцитемії. Пацієнтів обстежували відповідно до протоколу надання медичної допомоги, за-

твердженого МОЗ України, зокрема, всім хворим проводилося дослідження загального аналізу крові з цитологічним переглядом мазків, забарвлених за Май-Грюнвальдом; трепанобіопсія клубової кістки з подальшим гістологічним дослідженням біоптатів. Всі пацієнти підписали інформовану згоду на участь в дослідженні. Дослідження було погоджене з локальним етичним комітетом, і проводилося згідно принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицини та відповідних Законів України.

У роботі використовували цитогенетичні методи, зокрема культивування клітин *in vitro* аспірату КМ та периферійної крові (ПК). Препарати КМ готували за стандартним методом [7] без стимуляції. Цитогенетичний аналіз ПК проводили за авторським методом із використанням гранулоцитного колонієстимулюючого фактора (Г-КСФ) філграстиму для стимуляції мітотичного поділу циркулюючих стовбурових клітин, бластних клітин та інших незрілих мієлоїдних попередників із ПК (заявка на винахід України №а201505498 від 04.06.2015 р., автори Лозинський Р.Ю., Лозинська М.Р.). Також 1 хворій було проведено повторне цитогенетичне обстеження ПК у динаміці через 6 міс. після первинного обстеження. Застосовували G-метод диференційного забарвлення метафазних хромосом.

Із метою збереження проліферації клітин та уникнення спотворення результатів цитогенетичного аналізу перед забором ПК та КМ хворим рекомендували призупинити приймати препарати із цитотоксичною дією на термін від 3-х до 7-и діб. Для підтвердження аномалій, виявлених у ПК та КМ, в 1 хворій було виконано дослідження хромосом методом флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH). Застосовували мітки до прицентромерних ділянок 3-ої і 9-ої хромосом (D3Z1 і D9Z1): CEP3 (Spectrum Orange), CEP9 (Spectrum Aqua), (виробник "Abbott", США); та суміш зондів FISH CEP8 (Spectrum Aqua), LSI8q23.3 (Spectrum Red) (виробник "CytoCell", Великобританія) до прицентромерних ділянок і довгих плечей 8-ої хромосоми (D8Z2 і TRPS1).

Результати й обговорення

У жодного з хворих не спостерігали зниження рівня гемоглобіну нижче 100 г/л (таблиця), тому

Клінічна та генетична характеристика хворих на вторинний мієлофіброз

№	Стать//вік	Діагноз	Група ризику за DIPSS Plus [4]	Г	Л	Т	ЛФ	Каріотип	
								КМ	ПК
1	Ж/59	СП	Проміжного-1	156	5,6	155	Нор	Нор	в/м
2	Ж/51	СП	Низького	159	4,86	247	Нор	Нор	в/м
3	Ч/35	СП	Проміжного-2	124	31,3	896	Бл	Пат	Пат
4	Ж/67	СП	Проміжного-2	131	19,5	150	Бл	Пат	Пат
5	Ж/23	ЕТ	Проміжного-2	112	32,1	2400	Нор	Нор	в/м
6	Ж/56	СП	Проміжного-1	127	9,1	240	Бл	Нор	н/д
7	Ч/39	СП	Проміжного-1	119	19,1	390	Ан	Нор	в/м

Г - рівень гемоглобіну в крові у г/л; Л - рівень лейкоцитів у крові $\times 10^9$ /л; Т - рівень тромбоцитів у крові $\times 10^9$ /л; ЛФ - лейкоцитна формула; Ч - чоловіки; Ж - жінки; СП - трансформація справжньої поліцитемії у вторинний мієлофіброз; ЕТ - трансформація есенціальної тромбоцитемії у вторинний мієлофіброз; Нор - нормальний показник; Ан - аномальна ЛФ без бластних клітин; Бл - в ЛФ виявлено не менше 1% бластних клітин; Пат - патологічний каріотип з несприятливими цитогенетичними аномаліями; в/м - відсутність мітотичного поділу в препараті; н/д - дані не доступні

специфічної терапії анемічного синдрому не проводилося. У чотирьох хворих виявляли лейкоцитоз на час обстеження, з них у трьох рівень лейкоцитів у ході подальшого лікування знизився.

Лейкоцитна формула в 3 хворих (№1, 2, 5 у табл.) була нормальною, причому, в них не вдалося виявити мітотичної активності клітин ПК і провести цитогенетичний аналіз. У трьох інших хворих (№3, 4, 6 у табл.) виявляли до 2% бластних клітин ПК і було успішно проведено цитогенетичний аналіз. У двох хворих виявлено несприятливі цитогенетичні аномалії, зокрема як моносомію 7-ої хромосоми (№3 у табл.), трисомію 3-ої, 8-ої, 9-ої хромосом (№4 у табл.).

У всіх хворих виявлялася спленомегалія, причому, у 4 із них вона супроводжувалася значними больовими відчуттями.

Усі 6 хворих із трансформацією СП отримували терапію цитостатичними препаратами, з них 5 у різний час лікувалися гідроксисечовиною, а 1 - лише інтерфероном- α -2b. У хворій з трансформацією ЕТ перед включенням у дослідження проводилося лише симптоматичне лікування. Після проведення генетичних обстежень даній пацієнтці було розпочато терапію гідроксисечовиною зі задовільним ефектом. В інших хворих на фоні цитостатичної терапії вдавалося контролювати рівень тромбоцитів на рівні, який дозволяв забезпечити достатній гемостаз, і, водночас, не призводив до підвищення ризику тромботичних ускладнень.

Нижче наведено опис клінічного випадку, в якому дослідження метафазних хромосом за допомогою G-методу було верифіковане із викорис-

танням специфічних флюоресцентних міток методом FISH.

Опис клінічного випадку

Хвора віком 67 років (№4 у табл.) поступила в гематологічне відділення клініки ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН" з підозрою на ВМ (в анамнезі - справжня поліцитемія протягом 10 років). У хворій спостерігали явища гепатоспленомегалії; турбував періодичний біль розпираючого характеру помірної інтенсивності в лівому підребер'ї. В загальному аналізі крові виявляли нормальний рівень гемоглобіну, який становив 131 г/л (попри наявність в анамнезі високих показників на стадії поліцитемії - до 186 г/л). Вміст еритроцитів та гематокрит також були в межах норми. Рівень тромбоцитів поступово знижувався, досягнувши на час встановлення діагнозу показника 150×10^9 /л. Спостерігався лейкоцитоз $19,5 \times 10^9$ /л зі зсувом лейкоцитної формули вліво при цитологічному дослідженні - до бластів (2%), промієлоцитів (1%), мієлоцитів (5%), метамієлоцитів (1%), паличкоядерних нейтрофілів (13%). Сегментоядерні нейтрофіли становили 64 % лейкоцитів ПК, а моноцити - 2%. Виявлялася еозинофілія (6%) та базофілія (2%). Спостерігали лімфопенію (4 % лімфоцитів у мазку ПК). Враховуючи дані гістологічного дослідження трепанобіоптату було встановлено попередній діагноз: ВМ, трансформація справжньої поліцитемії, гепатоспленомегалія, лейкоцитоз, DIPSS-ризик: проміжний-2.

Для підтвердження діагнозу було проведено цитогенетичне дослідження КМ за стан-

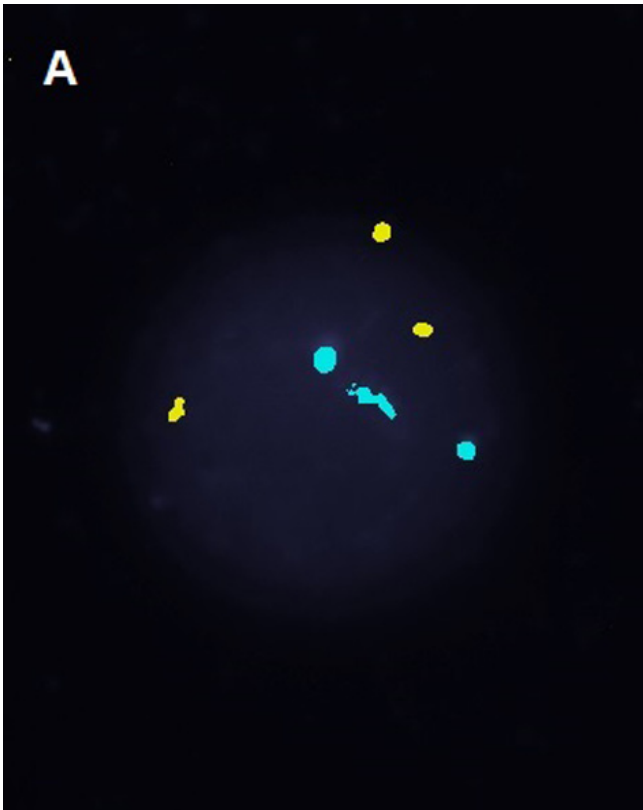


Рис. 1 А

Патологічного змінени інтерфазні ядра клітин кісткового мозку з трисомією 3-ої, 8-ої та 9-ої хромосом при дослідженні методом FISH: по 3 флюоресцентні сигнали від 3-ої хромосоми (жовті) та 9-ої хромосоми (блакитні)

дартним методом без мітогенної стимуляції зі забарвленням препаратів за G-методом [6]. Вста-

новлено клональний каріотип з трисомією 3-ої, 8-ої та 9-ої хромосом: 49,XX,+3,+8,+9, чим підтверджено діагноз ВМ. Мітотична активність в КМ була досить низькою (отримано 6 метафазних пластинок), що ускладнювало діагностику. Тому для уточнення даних каріотипування було проведено дослідження препарату КМ за допомогою методу FISH зі використанням міток до прицентромernih ділянок 3-ої і 9-ої хромосоми (D3Z1 і D9Z1), а також до прицентромernih ділянок і довгих плечей 8-ої хромосоми (D8Z2 і TRPS1). Отримано результати дослідження на 100 інтерфазних ядрах. Для першої пари міток каріотип препаратів КМ виглядав наступним чином (рис. 1А):

nuc ish(D3Z1,D9Z1) x3[88]/(D3Z1,D9Z1)x2[12].

Отже, у 88 ядрах спостерігалось по три сигнали від хромосоми 3 та хромосоми 9, що підтвердило домінування в КМ клітин з трисомією 3-ої та 9-ої хромосом. В 12 ядрах сигнали відповідали нормі, що може вказувати, як на наявність міноритарного клону клітин мієлоїдного походження без додаткових 3-ої та 9-ої хромосом, так і на присутність певного числа лімфоїдних елементів у КМ, які не повинні бути ураженими мієлопроліферативним процесом. Деяка інша картина отримана при використанні флуоресцентних міток для 8-ої хромосоми:

nuc ish(D8Z2,TRPS1)x2[68]/(D8Z2,TRPS1)x3[32].

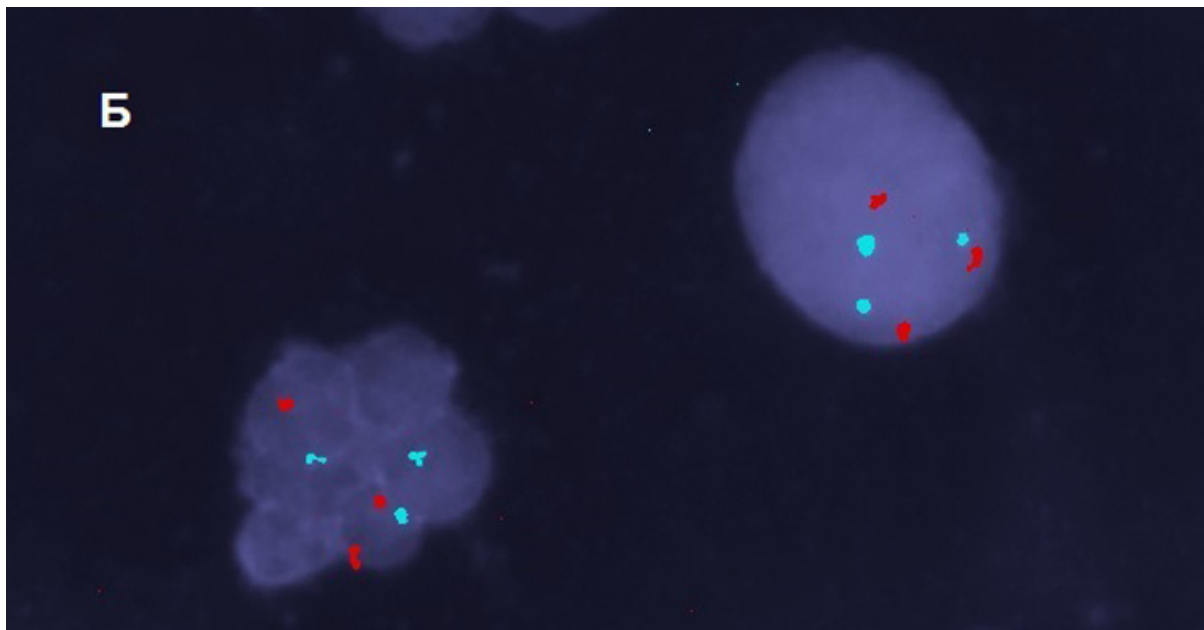


Рис. 1 Б

Патологічного змінени інтерфазні ядра клітин кісткового мозку з трисомією 3-ої, 8-ої та 9-ої хромосом при дослідженні методом FISH: по 3 флюоресцентні сигнали від прицентромernih ділянок (червоні) та довгих плечей (блакитні) 8-ої хромосоми



Рис. 2

Домінуючий патологічний клон клітин венозної крові хворої на ВМ. Каріотип: 49,XX,+3,+8,+9

У 32 клітинах КМ за даними дослідження методом FISH виявляли трисомію 8-ї хромосоми (рис. 1Б), однак у 68 клітинах кількісних змін даної хромосоми не було. Така висока частота нормальних сигналів вказує на наявність певної кількості клітин із трисомією лише 3-ої і 9-ї хромосом та відсутністю кількісних аномалій 8-ї хромосоми. Цей клітинний клон міг не виявлятися при дослідженні КМ за допомогою стандартного G-методу диференціального забарвлення метафазних хромосом через недостатню кількість метафазних пластинок для аналізу.

В один день з аспірацією КМ хворої було проведено цитогенетичне дослідження шляхом культивування *in vitro* клітин ПК з використанням Г-КСФ. В результаті проведеного дослідження отримано 18 метафазних пластинок задовільної якості та встановлено домінування в ПК клітинного клону з трисомією 3-ої, 8-ї та 9-ї хромосом (рис. 2), а також одну клітину з трисомією лише 3-ої та 9-ї хромосоми, та одну - з нормальним набором хромосом. Каріотип хворої за даними цього дослідження було встановлено як:

49,XX,+3,+8,+9[16]/48,XX,+3,+9[1]/46,XX[1].

Ці результати доповнювали дослідження

КМ за допомогою G-методу і не суперечили даним, отриманим методом FISH у КМ.

Для остаточної верифікації результатів, було також проведено дослідження препаратів ПК методом FISH. На 100 інтерфазних ядрах отримано каріотип для першої пари міток (до 3-ої та 9-ї хромосом):

nuc ish(D3Z1,D9Z1)x3[71]/(D3Z1,D9Z1)x2[29].

Таким чином, у ядрах 71 клітини спостерігали по три сигнали від 3-ої та 9-ї хромосом, тоді як в ядрах 29 клітин флюоресцентні сигнали вказували на нормальну кількість цих хромосом.

Для 8-ї хромосоми отримано такий результат дослідження ПК методом FISH:

nuc ish(D8Z2,TRPS1)x2[59]/(D8Z2,TRPS1)x3[41].

Отже, в 59 клітинах сигнали від хромосоми 8 відповідали нормі (рис. 3А), а в 41 клітині візуалізувалося по три пари сигналів від хромосоми 8 (рис. 3Б), що підтверджувало дані каріотипування ПК G-методом.

Трисомія 8-ї хромосоми є негативною прогностичною ознакою при ВМ [7], як і наявність трьох і більше цитогенетичних аномалій. Такі хворі мають суттєво меншу тривалість очікуваного життя, у них частіше і швидше відбувається трансформація в гостру лейкемію, а отже, вони потребують активного лікування, зокрема, аlogenної трансплантації КМ.

Аномалії каріотипу, які вдалося встановити при культивуванні клітин ПК *in vitro* з вико-

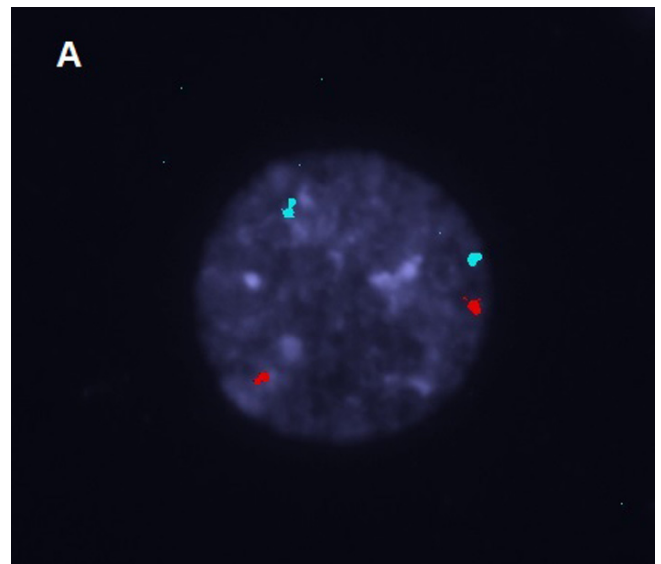


Рис. 3 А

Интерфазні ядра клітин крові при дослідженні методом FISH: без аномалій 8-ї хромосоми - 2 пари флюоресцентних сигналів від прицентромєричних ділянок (червоні) та довгих плечей (блакитні) цієї хромосоми

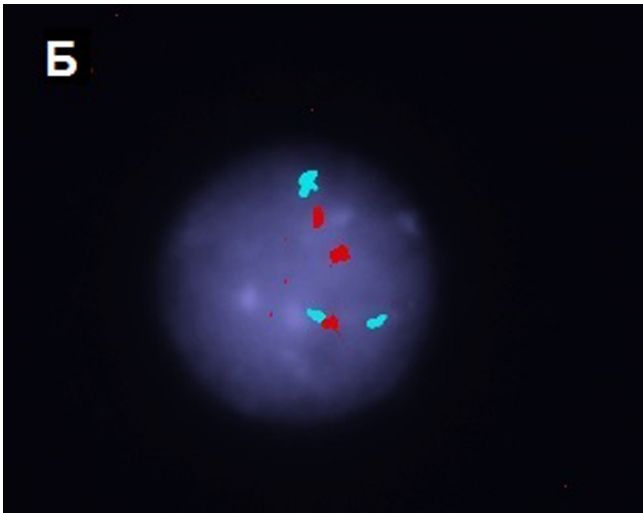


Рис. 3 Б

Интерфазні ядра клітин крові при дослідженні методом FISH: трисомія 8-ої хромосоми - по 3 флуоресцентні сигнали від прицентромерних ділянок (червоні) та довгих плечей (блакитні)

ристанням Г-КСФ, співпали аномаліями, виявленими з використанням стандартних методик у клітинах з аспірату КМ. Однак при використанні авторського методу зі специфічною стимуляцією мієлоїдних клітин-попередників ПК мітотичний індекс був вищим, а диференційний рисунок - чіткішим. Повторне цитогенетичне дослідження ПК через 6 місяців не виявило клональної еволюції - спостерігався попередній комплексний каріотип. При цьому стан хворої погіршився, значно знизився рівень гемоглобіну (до 98 г/л), наростала спленомегалія та загальна слабкість.

Висновки

1. Застосування цитогенетичного дослідження ПК поряд із дослідженням КМ дозволило якісніше провести аналіз каріотипу хворих на ВМ.
2. Виявлення цитогенетичних аномалій дозволяє виключити наявність у хворого ВМ без специфічного ураження мієлоїдних кровотворних клітин та розпочати адекватну терапію.
3. Використання методу FISH дозволило збіль-

шити чутливість цитогенетичного дослідження, підтвердити наявність сумнівних аномалій у випадку недостатньо якісних препаратів метафазних хромосом, забарвлених за G-методом, ефективніше виявляти та підтверджувати гетерогенність патологічних клонів клітин.

Література

1. Michiels JJ, Valster F, Wielenga J, Schelfout K, De Raeve H: European vs 2015-World Health Organization clinical, molecular and pathological classification of myeloproliferative neoplasms. *World J Hematol* 2015, 4, 16-53.
2. Pistevou-Gombaki K, Zygogianni A, Kantzou I, Kyrgias G, Mystakidou K, Kouvaris J, Klonizakis I, Tsirigotis P, Pappa V, Siakantari M, Eleftheriadis N, Georgakopoulos J, Sarris G, Kelekis N, Kouloulis V: Splenic irradiation as palliative treatment for symptomatic splenomegaly due to secondary myelofibrosis: a multi-institutional experience. *JBUON* 2015, 20, 1132-1136.
3. Mehtaa J, Wanga H, Sheikh Usman Iqbal & Ruben Mesa: Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States. *Leuk Lymphoma* 2014, 55, 595-600.
4. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, Van Dyke D, Hanson C, Wu W, Pardani A, Cervantes F, Passamonti F, and Tefferi A: DIPSS Plus: A Refined Dynamic International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis That Incorporates Prognostic Information From Karyotype, Platelet Count, and Transfusion Status. *J Clin Oncol* 2011, 29, 392-397.
5. Passamonti F, Vannucchi A, Caramazza D, Rambaldi A, Morra E, Kiladjian JJ, Komrokji RS, Maffioli M, Gotlib J, Cervantes F, Devos T, Silver RT, Guglielmelli P, Vianelli N, De Stefano V, Ruggeri M, Specchia G, Vitolo U, Rumi E, Mora B, Barbui T, Pieri L, Pascutto C, and Cazzola M: A New International Multicenter-Based Model to Predict Survival in Myelofibrosis Secondary to Polycythemia and Thrombocythemia: The Mysec Prognostic Model (MYSEC-PM). *Blood* 2014, 124, 1826-1826.
6. Tamari R; Castro-Malaspina H: Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for primary myelofibrosis and myelofibrosis evolved from other myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol* 2015, 22, 184-190.
7. Dos Santos LC, da Costa Ribeiro JC, Silva NP, Cerutti J, da Silva MR, Chauffaille Mde L: Cytogenetics, JAK2 and MPL mutations in polycythemia vera, primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011, 33, 417-424.