

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ФАКТОРИ ПРОГНОЗУ ПРИ ГОСТРИХ ЛІМФОБЛАСТНИХ ЛЕЙКЕМІЯХ

О.В. Зотова¹, А.С. Лук'янова¹, М.О. Вальчук¹,
Г.Б. Лебедь², В.Є. Логінський¹

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

²Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Резюме. Цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку та/або периферичної крові проведено у 34 хворих на гостру лімфобластну лейкемію (ГЛЛ). Цитогенетичні аномалії різного характеру виявлено у 25 (74%) хворих. З урахуванням аналізу каріотипу хворих класифіковано на три групи ризику. Цитогенетичні методи повинні бути включені у стандарти обстеження хворих на гострі лейкемії.

Ключові слова: гостра лімфобластна лейкемія, каріотип, цитогенетична аберація, прогноз.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ

Е.В. Зотова¹, А.С. Лукьянова¹, М.А. Вальчук¹, Г.Б. Лебедь², В.Е. Логинский¹

¹ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины
НАМН Украины», Львов

²Львовський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Резюме. Цитогенетическое исследование клеток костного мозга и/или периферической крови проведено у 34 больного острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Цитогенетические аномалии различного характера выявлены у 25 (74%) больных. С учетом анализа каріотипа больные классифицированы на группы риска. Цитогенетические методы должны быть включены в стандарты обследования больных острыми лейкозами.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, каріотип, цитогенетическая аберація, прогноз.

CYTOGENETIC PROGNOSTIC FACTORS IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

O.V. Zotova¹, A.S. Lukyanova¹, M.O. Valchuk¹, G.B. Lebed², V.E. Loginsky¹

¹SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine», Lviv
²Danylo Halytsky Lviv National Medical University

Summary. Cytogenetic analysis of bone marrow and/or peripheral blood cells from 34 patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) was performed. Cytogenetic

abnormalities of various kinds were found in 25 (74%) patients. According to the karyotype analysis patients were classified by risk groups. Thus, cytogenetic methods should be included in the standard examination of patients with acute leukemia.

Key words: *acute lymphoblastic leukemia, karyotype, cytogenetic aberration, prognosis.*

Гострі лімфобластні лейкемії (ГЛЛ) характеризуються різноманітним клінічним перебігом і різною чутливістю до терапії. Ключова подія у розвитку ГЛЛ – перебудови геному клітин-попередників. Визначення специфічних цитогенетичних аномалій злоякісних клітин набуває щораз більшого діагностичного та прогностичного значення. На підставі дослідження каріотипу хворого встановлюється група ризику перебігу хвороби, а також підбирається ефективна схема лікування [4, 6]. Цитогенетичні дослідження злоякісних клітин у хворих на ГЛЛ дозволяють виявити клональні хромосомні перебудови в 60–85% випадків. Однак, у 10–20% пацієнтів отримати мітози задовільної якості досить важко. Особливо важко інтерпретувати цитогенетичні дослідження при масивній гіпердипloidії у зв'язку з поганим розкладом і взаємним накладанням хромосом [5].

Метою роботи була оцінка діагностичного та прогностичного значення змін каріотипу у хворих на ГЛЛ.

Матеріали і методи досліджень. Цитогенетичні дослідження злоякісних клітин проведено у 34 хворих на ГЛЛ. 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 [1, 3]. Забарвлені препарати аналізували при збільшенні $\times 1000$ під світловим мікроскопом Olympus BX41 (Olympus, Японія) з використанням системи для хромосомного аналізу CytoVision (Applied Imaging, Великобританія). При аналізі та описі каріотипу дотримувались критеріїв *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* – ISCN, 2009 [8]. 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. [7] з урахуванням рекомендацій виробника мітки.

Результати та їх обговорення. Дослідна група включила 34 хворих на ГЛЛ (табл. 1). Цитогенетичні аномалії різного характеру виявлено у 24 (71%) хворих. У одного хворого придатних для аналізу

метафазних пластинок не отримано, однак дослідження FISH показало наявність химерного гена *BCR/ABL*. Загалом, у 25 (74%) з 34 пацієнтів з ГЛЛ спостерігали цитогенетичні перебудови різного характеру, що збігається з повідомленнями літератури [2]. У зразках, отриманих від 9 (26%) хворих, виявлено нормальний каріотип без цитогенетично видимих змін.

Найбільш частим типом аберації при ГЛЛ була філадельфійська (Ph) хромосома, утворена внаслідок транслокації $t(9;22)(q34;q11)$. Вона виявлена у 6 хворих (№№ 1-6), а це становить 18% випадків ГЛЛ із змінами каріотипу. В двох з них (№ 1 та № 2) це була єдина перебудова каріотипу, але оскільки в одному випадку (№ 2) було виконано лише дослідження FISH на наявність гена *BCR/ABL*, достовірно стверджувати відсутність інших змін в цього пацієнта не можна. У 4 хворих, крім філадельфійської хромосоми, спостерігали додаткові зміни. Серед них у 2 хворих, крім Ph-хромосоми, виявлено трисомію 8 та додаткову копію Ph (№ 3 та № 4). Ще в одного хворого (№ 5) встановлено наявність делеції довгого плеча 7 хромосоми та додаткову копію Ph. У хворої № 6 виявлено 2 копії Ph-хромосоми в складі гіпердиплоїдного каріотипу (57 хромосом).

Наявність транслокації $t(4;11)(q21;q23)$ стверджено у 2 пацієнтів (№ 7 та № 8). В одному випадку (№ 7) це була єдина зміна, у другому (№ 8) – вона входила до складу гіпердиплоїдного каріотипу (77 хромосом).

Ще в 4 пацієнтів (№№ 9–12) встановлено наявність множинних структурних та кількісних перебудов каріотипу. В хворого № 9 виявлено моносомії 4, 14 та 17 хромосом, трисомії 8 та 22, дві маркерні хромосоми невстановленого походження. В хворого №10 визначено наявність структурних змін 1, 3 та 16 хромосом. У пацієнта № 11 виявлено дериват хромосоми 1, моносомії хромосом 2, 4 та 5, три маркерні хромосоми невстановленого походження. У хворого № 12 встановлено наявність гіподиплоїдного каріотипу (41-43 хромосом).

У 7 наступних пацієнтів (№№ 13-19) виявлено по дві перебудови в каріотипі, а саме – $dup(1)(q21q32)$ і $+del(6)(q13q21)$ у хворого № 13, $ins(1;10)(q22;q23q26)$ і $t(8;14)(q24;q32)$ у хворого № 14, транслокації $t(2;9)(q11.2;q34)$ і $t(11;14)(q23;q32)$ у пацієнта № 15, $der(6)t(6;7)(q13;q11)$ і $del(7)(q11)$ у хворого № 16, моносомію 7 хромосоми і $del(17)(p12)$ у хворої № 17, $del(11)(q23)$ і $add(14)(q32)$ у пацієнта № 18 та додаткову хромосому групи C і $add(14)(q32)$ у хворого № 19.

Ще в 4 пацієнтів (№№ 20-23) виявлено по одній зміні в каріотипі, а саме – відсутність Y-хромосоми у пацієнта № 20, ізохромосому $i(7)(q10)$ у хворої № 21, транслокацію $t(8;14)(q24;q11)$ у хворого № 22 та делецію короткого плеча 9 хромосоми $del(9)(p21)$ у пацієнта № 23.

У пацієнтів № 24 та № 25 встановлено наявність гіпердиплоїдного каріотипу з кількістю хромосом 61 та 66, відповідно.

У зразках, отриманих від 9 пацієнтів (№№ 26–34), виявлено нормальний каріотип без цитогенетично видимих змін.

Отримані результати цитогенетичного аналізу дозволили розподілити пацієнтів з ГЛЛ на три групи ризику перебігу хвороби. До першої групи хворих з прогностично несприятливими цитогенетичними маркерами включено 12 випадків. До цієї групи увійшло 6 пацієнтів (№№ 1–6) з Ph-хромосомою, 2 хворих (№ 7 та № 8) з $t(4;11)(q21;q23)$ та 4 пацієнти (№№ 9–12) з множинними цитогенетичними змінами. Медіана виживання 11 із 12 обстежених хворих на ГЛЛ з несприятливими цитогенетичними маркерами не перевищувала 12 місяців. Одна пацієнтка із першої групи (хвора № 7 з ізольованою транслокацією $t(4;11)(q21;q23)$) на цей час продовжує лікування.

До другої групи хворих з маркерами проміжного прогнозу включено 20 випадків. До цієї групи увійшли пацієнти з нетиповими або рідкісними хромосомними перебудовами (11 випадків, №№ 13–23) та з нормальним каріотипом (9 випадків, №№ 26–34). Літературні дані щодо прогностичного значення нормального каріотипу та рідкісних перебудов у хворих на ГЛЛ суперечливі [2]. Результати лікування цих хворих значно відрізняються один від одного, що співпадає з нашими спостереженнями і потребує подальшого вивчення.

До останньої групи включено пацієнтів з прогностично сприятливими цитогенетичними маркерами – 2 випадки масивної гіпердиплоїдії (№ 24 та № 25). У хворих № 6 та № 8 також виявлено гіпердиплоїдний набір хромосом, але він водночас супроводжувався прогностично несприятливими перебудовами – транслокаціями $t(9;22)(q34;q11)$ та $t(4;11)(q21;q23)$, відповідно. Як відомо, масивна гіпердиплоїдія є фактором сприятливого прогнозу при ГЛЛ. Однак виявлення прогностично несприятливих структурних перебудов у складі гіпердиплоїдного каріотипу значно погіршує прогноз перебігу хвороби [5], що узгоджується з нашим спостереженням. У пацієнта № 8 з масивною гіпердиплоїдією та транслокацією $t(4;11)(q21;q23)$ ГЛЛ мала агресивний перебіг і, незважаючи на інтенсивну цитостатичну терапію, через 2 міс. він помер. Пацієнтка № 6 від лікування відмовилась.

Розподіл пацієнтів з ГЛЛ на групи ризику відповідно до виявлених цитогенетичних маркерів дозволяє підібрати найоптимальнішу тактику їх лікування, а саме: інтенсивність терапії, необхідність призначення інгібіторів тирозинкінази при ГЛЛ з $t(9;22)(q34;q11)$, необхідність проведення трансплантації кісткового мозку вже у 1-й ремісії [2, 4]. Інгібітори тирозинкінази були включені у схеми поліхіміотерапії у 3 хворих на Ph-позитивну ГЛЛ (№ 2, № 4 та № 5), що в одному випадку (№ 4) дозволило поліпшити результат лікування – досягнути повної ремісії із загальним виживанням протягом 24 місяців. У хворої № 7 з

ізолюваною транслокацією t(4;11)(q21;q23) проведена алогенна трансплантація кісткового мозку, що дозволило швидко досягнути ремісії з довгим періодом безрецидивного виживання (36 місяців).

Таблиця

Результати цитогенетичних досліджень бластних клітин у хворих на ГЛЛ

№	Каріотип	Дослідження FISH
1	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[5]/46,XX[11]	BCR/ABL (+) (93%)
2	Відсутні метафази	BCR/ABL (+) (79%)
3	48,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[10]/ 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[6]/46,XX[4]	Не проводили
4	48,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[9]/46,XX[11]	Не проводили
5	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[14]/46,XY,t(9;22)(q34;q11),del(7) (q31)[3]/47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[3]	Не проводили
6	57,XX,+X,+2,+4,+6,+8,t(9;22)(q34;q11),+11,+14,+17,+21, +21,+der(22)t(9;22)[20]	Не проводили
7	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[5]/46,XX[9]	Не проводили
8	77,XXY,t(4;11)(q21;q23)x2,+13,+16,+17,+18,+19,+20,+21, +22[20]	Не проводили
9	46~48,XY,-4,+8,-14,-17,+22,+mar1,+mar2[cp20]	Не проводили
10	46,XY,del(1)(q21),der(1)(p3?2>q44::p3?2pter),der(3)(?::3p1?3> 3q2?7),der(16)t(1;16)(q21;p1?3)del(16)(q12)[19]/46,XY[3]	Не проводили
11	46,XY,der(1),-4,-5,+mar1,+mar2[9]/ 45,XY,der(1),-2,-4,-5,+mar1,+mar3[4]/46,XY[9]	Не проводили
12	гіперплоїдія (41-43 хромосоми)	Не проводили
13	47,XY,dup(1)(q21q32),+del(6)(q13q21)[16]/46,XY[4]	Не проводили
14	46,XY,ins(1;10)(q22;q23q26),t(8;14)(q24;q32)[20]	Не проводили
15	46,XY,t(2;9)(q11.2;q34),t(11;14)(q23;q32)[17]/46,XY[3]	Не проводили
16	46,XY,der(6)t(6;7)(q13;q11),del(7)(q11)[10]/46,XY[10]	Не проводили
17	45,XX,-7,del(17)(p12)[15]/46,XX[5]	Не проводили
18	46,XY,del(11)(q23),add(14)(q32)[20]	Не проводили
19	46,XY,add(14)(q32)[17]/47,XY,+C,add(14)(q32)[2]/46,XY[1]	Не проводили
20	45,X,-Y[15]/46,XY[2]	Не проводили
21	46,XX,i(7)(q10)[14]/46,XX[10]	Не проводили
22	46,XY,t(8;14)(q24;q11)[6]/46,XY[17]	Не проводили
23	46,XY,del(9)(p21)[18]/46,XY[2]	Не проводили
24	гіперплоїдія (61 хромосома)	Не проводили
25	гіперплоїдія (66 хромосом)	Не проводили
26-34	46,XX або 46,XY	Не проводили

Отже, цитогенетичні дослідження дозволили виявити асоційовані з ГЛЛ цитогенетичні аномалії у 74% 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. Розподіл пацієнтів на прогностичні групи дозволяє підібрати найоптимальнішу тактику їх лікування.

Таким чином, встановлено високу інформативність цитогенетичних методів дослідження для діагностики та прогнозування перебігу ГЛЛ, що свідчить про необхідність їх включення до переліку обов'язкових методів обстеження хворих на ГЛЛ.

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 // Москва: МЕДпресс-информ, 2006. – 122 с.
3. Analiza cytogenetyczna w nowotworach hematologicznych (poradnik) / В. Pieńkowska-Grela, J. Brycz-Witkowska, E. Chmarzyńska-Mróż i wsp. – Warszawa: Centrum Onkologii, 2004. – 59 s.
4. Bain, B.J. Leukaemia diagnosis. 4th edn / B.J. Bain – NJ: Wiley-Blackwell, 2010. – 403 p.
5. Chromosome and other prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia: a long-term follow-up / L.M. Secker-Walker, J.M. Chessels, E.I. Stewart et al. // Br. J. Haematol. – 1989. – Vol. 72. – P. 336–342.
6. Mrozek, K. Cytogenetics in acute leukemia / K. Mrozek, N.A. Heerema, C.D. Bloomfield // Blood Rev. – 2004. – Vol. 18. – P. 15–36.
7. 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.
8. 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.