

## ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛЕЙКЕМІЧНИХ КЛІТИН НА РІЗНИХ ЕТАПАХ ПЕРЕБІГУ ГОСТРИХ ЛЕЙКЕМІЙ

О. Зотова<sup>1\*</sup>, А. Лук'янова<sup>2</sup>, М. Вальчук<sup>1</sup>, Ю. Кароль<sup>3</sup>, Н. Горон<sup>3</sup>,  
О. Шалай<sup>1</sup>, В. Логінський<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут патології крові  
та трансфузійної медицини НАМН України»  
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна

<sup>2</sup>Медико-біологічний центр «Геном»  
вул. Коперника, 23, Київ 04216, Україна

<sup>3</sup>Комунальна 5 міська клінічна лікарня  
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна  
e-mail: [lnkzotova@gmail.com](mailto:lnkzotova@gmail.com)

Цитогенетичні дослідження клітин кісткового мозку та/або периферичної крові проведено у 11 хворих (хворі віком від 18 до 47 років, серед них 6 чоловіків і 5 жінок) на різних етапах перебігу гострих лейкемій (ГЛ): при встановленні діагнозу, під час ремісії хвороби й у разі рецидиву. Використовували метод класичної цитогенетики (GTG) та флуоресцентну *in situ* гібридизацію (FISH). Цитогенетичні дослідження було виконано згідно зі стандартними методиками, а каріотиби – описано відповідно до *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2016). Виявлено структурні (del(1)(q24), i(7)(q10), t(8;21)(q22;q22), del(9)(q21-q22), t(9;22)(q34;q11), t(15;17)(q22;q11-21), der(17)t(17;?)(p11;?), маркерні хромосоми) та кількісні (трисомії, моносомії) хромосомні аномалії. Деякі генетичні перебудови (фузійні гени *BCR/ABL* та *PML/RARA*) виявлено за допомогою молекулярно-генетичних методів (FISH). Спектр хромосомних аберацій у хворих на ГЛ має важливе діагностичне та прогностичне значення. Діагностика ГЛ можлива завдяки наявності характерних генетичних аномалій-маркерів, що дає змогу підтвердити деякі типи ГЛ, а саме: t(8;21)(q22;q22) виявляють у хворих на гостру мієлоїдну лейкемію M2 (ГМЛ M2); t(15;17)(q22;q11-21) – у пацієнтів із гострою промієлоцитарною лейкемією (ГПЛ); t(9;22)(q34;q11) – у хворих із гострою лімфобластною лейкемією (ГЛЛ). З урахуванням виявлених цитогенетичних аномалій хворих на ГЛ класифіковано на три групи ризику: група хворих зі сприятливими цитогенетичними маркерами, група проміжного ризику без прогностично значущих маркерів і група хворих із несприятливими факторами прогнозу. Розподіл хворих на групи ризику відповідно до виявлених прогностичних маркерів дає змогу підібрати оптимальну тактику їхнього лікування, а саме: інтенсивність терапії, необхідність проведення трансплантації кісткового мозку вже у ремісії I, необхідність призначення інгібіторів тирозинкінази при ГЛ з t(9;22)(q34;q11) або диференціального агента – повної транс-ретиноевої кислоти (ATRA) при ГМЛ з t(15;17)(q22;q11-21). Цитогенетичні методи мають бути включені у стандарти обстеження хворих на ГЛ для діагностики, прогнозування перебігу та підбору оптимальної тактики лікування. Крім обов'язкового аналізу диференціально-зафарбованих хромосом, у хворих на ГЛ необхідно застосовувати молекулярно-генетичні дослідження, а саме: метод FISH, а також полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

*Ключові слова:* гостра лейкемія, каріотип, цитогенетичні аномалії, діагноз, прогноз

У гематології спостерігається тенденція до дедалі глибшого вивчення біології лейкемічних клітин, що стає підставою для виділення окремих варіантів лейкемій, їхньої про-

гностичної оцінки та вибору адекватної терапії. Однак в Україні досі використовуються прогностичні системи, які не враховують сучасних досягнень у цитогенетиці й молекулярній генетиці, в той час як впровадження лікування злоякісних неоплазій гемопоетичної та лімфоїдної систем препаратами цільової дії, опрацювання показань для трансплантації кісткового мозку, діагностування мінімальної залишкової хвороби неможливі без адекватної оцінки ефективності проведеного лікування на підставі визначення цитогенетичних і молекулярно-генетичних ознак лейкемічних клітин, а також з'ясування прогностичних чинників перебігу хвороби. Визначення характерних генетичних аномалій злоякісних клітин набуває дедалі більшого клінічного значення і у хворих на гострі лейкемії (ГЛ). Вони передбачені новою класифікацією ГЛ – ВООЗ, 2016 [5, 16].

Початкове цитогенетичне обстеження згідно з рекомендаціями провідних міжнародних організацій має обов'язково проводитись у первинних хворих для підтвердження, уточнення діагнозу або диференційної діагностики ГЛ. Аналіз метафазних хромосом проводять з метою опису каріотипу хворого. Коли ж мітозів немає або їхня якість незадовільна, використовують молекулярно-цитогенетичний метод флуоресцентної *in situ* гібридації (FISH), який дає можливість виявити діагностичні (маркерні) перебудови, наприклад, t(15;17)(q22;q11-21) під час гострої промієлоцитарної лейкемії (ГПЛ); t(8;21)(q22;q22) під час гострої мієлоїдної лейкемії M2 (ГМЛ M2); t(9;22)(q34;q11) під час гострої лімфобластної лейкемії (ГЛЛ) та інші. У цьому разі, однак, не буде виявлено інших перебудов каріотипу [3, 7, 15].

Планові контрольні цитогенетичні обстеження проводять після курсів поліхіміотерапії (ПХТ) або під час лікування препаратами цільової дії, наприклад, диференціувальним агентом – повною транс-ретиноевою кислотою (АТРА) при ГПЛ чи інгібіторами тирозинкінази при Ph-позитивних ГЛ. Зазвичай контрольні обстеження виконують як мінімум через 2 тижні після курсу ПХТ (після виходу з аплазії) і раз на пів року/рік під час лікування препаратами цільової дії [3, 7, 15].

Цитогенетичне дослідження показано також за різкої зміни клінічної картини хвороби (поява ознак прогресування або рецидиву). Під час рецидиву ГЛ проводять аналіз диференційно-зафарбованих хромосом. Коли ж мітозів немає або їхня якість незадовільна, використовують FISH-дослідження. У таких випадках часто виявляють клональну еволюцію у вигляді появи додаткових аномалій або нових субклонів клітин [3, 7, 15].

Оцінка мінімальної залишкової хвороби при ГЛ передбачає проведення комплексного цитогенетичного та молекулярно-генетичного дослідження. Застосування цитогенетичних методів з метою моніторингу мінімальної залишкової хвороби обмежене їхньою невисокою чутливістю. Метод диференційно-зафарбованих хромосом характеризується невеликою кількістю метафазних пластинок, які піддаються аналізу (20–50 клітин), та високою імовірністю того, що серед них не буде лейкемічних. За повної цитогенетичної ремісії (наявності нормального каріотипу в усіх проаналізованих метафазах) необхідно підтвердити відсутність аберантного клону клітин за допомогою молекулярно-генетичних методів (FISH) і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із відповідними зондами або праймерами. Тому дуже важливою є початкова оцінка хромосомних аномалій, оскільки методи молекулярної генетики дають дуже точну, але вибіркиму детекцію окремих змін. З використанням FISH можна проаналізувати 200–500 клітин, але його чутливість залежить від кількості хибно-позитивних сигналів. Найчастіше для моніторингу мінімальної залишкової хвороби використовують метод ПЛР у зв'язку з його високою чутливістю (одна клітина на  $10^3$ – $10^6$  проаналізованих) [3, 7, 15]. Особлива увага в літературі, яка стосується мінімальної залишкової хвороби при ГЛ, приділяється вивченню та вдосконаленню сучас-

них методів діагностики мінімальної залишкової хвороби – скануванню нового покоління та високочутливій проточній цитометрії [9, 17].

Спектр цитогенетичних і молекулярно-генетичних перебудов у хворих на різних етапах перебігу ГЛ має важливе діагностичне та прогностичне значення для вибору оптимальної тактики лікування пацієнтів. Цитогенетичні методи дослідження необхідні для встановлення, підтвердження або спростування діагнозу, а також для проведення диференційної діагностики підтипу хвороби та прогнозування перебігу ГЛ. Це можливо завдяки наявності характерних генетичних аномалій-маркерів, деякі з них можуть бути одночасно і діагностичними, і прогностичними маркерами. Їх можна виявити як методом каріотипування, так і FISH-аналізом [3, 6, 8].

Після проведеного лікування ГЛ за допомогою цитогенетичного дослідження можна точніше оцінити вплив препаратів на лейкомічний клон. Поява клітин із нормальним каріотипом свідчить про його елімінацію, повна нормалізація каріотипу – про наявність цитогенетичної ремісії. Тому особливого значення цитогенетичні методи набувають за використання сучасних препаратів цільової дії. Виявлення нових змін у наявному клоні клітин або нових клонів є маркером прогресії ГЛ і сигналізує про необхідність модифікації режиму лікування. Повторна поява клітин із аномальним каріотипом після досягнення цитогенетичної ремісії є однією з ознак рецидиву ГЛ. Тому дуже важливе проведення цитогенетичного дослідження під час встановлення діагнозу перед початком лікування, оскільки пізніше не буде відомо, чи аномалії виявлені первинно, чи вони виникли під час еволюції хвороби або індуковані лікуванням. За допомогою цитогенетичних методів також можна оцінити ефективність трансплантації КМ у хворих на ГЛ за співвідношенням клітин донора і реципієнта (якщо вони відрізняються за статтю) [3, 6, 8].

Метою роботи було з'ясувати спектр цитогенетичних і молекулярно-генетичних аномалій лейкомічних клітин на різних етапах перебігу ГЛ та визначити їхнє діагностичні прогностичне значення.

### Матеріали та методи

Цитогенетичні дослідження лейкомічних клітин на різних етапах перебігу ГЛ проведено у 11 хворих віком від 18 до 47 років (6 чоловіків і 5 жінок). Серед обстежених хворих у 2 осіб діагностовано ГМЛ, у 7 – ГЛЛ та у 2 – білінійну ГЛ. Діагноз у хворих встановлено на основі клініко-гематологічних, цитологічних та імунофенотипових досліджень. Хворих на ГМЛ розділено на варіанти за Франко-американсько-британською (FAB) класифікацією: М2 (1 хворий), М3 (1 хворий). У свою чергу, при ГЛЛ виділено В-клітинну (5 хворих) і Т-клітинну (2 хворих) лейкомію (табл. 1).

Зразки лейкомічних клітин від хворих отримували шляхом аспіраційної біопсії кісткового мозку (КМ). Якщо ж одержати клітини КМ не вдавалося, то аналізували лейкомічні клітини периферичної крові (ПК), отримані під час венепункції. Використовували загальноприйнятий метод 24- та 48-годинного культивування клітин КМ та/або ПК *in vitro*. Обробку клітин проводили за загальноприйнятою методикою, яка включала дію колхцину, гіпотонізацію, фіксацію і приготування препаратів. Аналіз метафазних хромосом проводили із застосуванням G-методики диференційного забарвлення фарбою Райта [1, 13]. Забарвлені препарати аналізували на збільшенні  $\times 1000$  під світловим мікроскопом Olympus BX41 (Olympus, Японія) з використанням системи для хромосомного аналізу CytoVision (Applied Imaging, Великобританія). Проводили аналіз не менше 20 метафазних пластинок. Під час аналізу й опису каріотипу дотримувалися критеріїв *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* – ISCN, 2016 [11]. За відсутності придатних до аналізу метафазних пластинок додатково застосовували молекулярно-цитогенетичний метод FISH із від-

повідними зондами. Підготовку препаратів і процедуру гібридизації здійснювали за Pinkel et al. [14] з урахуванням рекомендацій виробника зонда. Аналізували не менше 200 клітин.

### Результати і їхнє обговорення

Цитогенетичні дослідження (аналіз каріотипу та FISH) зляжисних клітин виконано у 11 пацієнтів на різних етапах перебігу ГЛ: під час встановлення діагнозу, під час ремісії хвороби та у разі рецидиву. Результати цитогенетичного аналізу представлені в табл. 1.

Таблиця 1

#### Результати цитогенетичних досліджень лейкомічних клітин у хворих на ГЛ

№ п/п	Стать	Варіант ГЛ	Етап перебігу ГЛ	Вік, років	Каріотип	Дослідження FISH
1	Ч.	ГМЛ М2	Встановлення діагнозу	45	46,XY[20]	Не проводили
2	Ч.	ГМЛ М3 (ГПЛ)	Рецидив I	47	46,XY[20]	Не проводили
			Встановлення діагнозу	18	46,XY[20]	<i>PML/RARA</i> (+) (97%)
3	Ж.	В-ГЛЛ	Рецидив I	19	46,XY[20]	<i>PML/RARA</i> (+) (92,5%)
			Встановлення діагнозу	33	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	<i>BCR/ABL</i> (+) (33,3%)
4	Ж.	В-ГЛЛ	Рецидив I	34	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[7]/46,XX[14]	Не проводили
			Встановлення діагнозу	45	46,XX,i(7)(q10)[14]/46,XX[6]	Не проводили
5	Ж.	В-ГЛЛ	Рецидив I	47	54~55,XX,+2,+6,+8,+10,+11,+12,+17,+18,+21[8]/46,XX[14]	Не проводили
			Ремісія	30	46,XX[20]	Не проводили
6	Ч.	В-ГЛЛ	Рецидив II	30	46,XX[20]	Не проводили
			Рецидив I	31	46,XX[20]	Не проводили
7	Ж.	В-ГЛЛ	Рецидив I	24	46,XY[20]	Не проводили
			Ремісія	24	46,XY[20]	Не проводили
8	Ж.	Т-ГЛЛ	Рецидив II	27	46,XY[20]	Не проводили
			Рецидив I	20	60~61,XX,+X,+1,+3,+4,+6,+8,+9,+10,+11,+14,+15,+17,+18,+21,+mar[3]/46,XX[18]	<i>BCR/ABL</i> (-), с-MYC (3 копії) (82%)
9	Ч.	Т-ГЛЛ	Ремісія	20	46,XX[20]	Не проводили
			Рецидив II	22	60~61,XX,+X,+1,+3,+4,+6,+8,+9,+10,+11,+14,+15,+17,+18,+21,+mar[3]/46,XX[17]	Не проводили
10	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив I	36	48,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[9]/46,XX[11]	Не проводили
			Ремісія II	37	46,XX[20]	Не проводили
11	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив II	37	46~52,XX,del(1)(q24),+1,+3,+6,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)x1~2,+mar[cp15]/46,XX[5]	Не проводили
			Рецидив III	38	Відсутні метафазні пластинки	<i>BCR/ABL</i> (-) <i>BCR/ABL</i> (+) (15%)
12	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив IV	38	46~48,XX,del(1)(q24),+1,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22),+mar[cp7]/46,XX[23]	Не проводили
			Ремісія	22	46,XY[20]	Не проводили
13	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив I	25	46~47,XY,der(17)t(17;?)(p11;?),-18,+1~2mar[cp14]/46,XY[6]	Не проводили
			Встановлення діагнозу	21	46,XY,t(9;22)(q34;q11),+21[20]	Не проводили
14	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив I	21	79~92,XXYY[cp5]/46,XY[18]	Не проводили
			Встановлення діагнозу	21	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q21-22)[5]/46,XY[15]	Не проводили
15	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив I	23	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q21-22)[4]/46,XY,-C,+mar[2]/46,XY[12]	Не проводили

У 2 пацієнтів із ГМЛ (варіанти М2 (№ 1) та М3 (№ 2) за FAB-класифікацією) первинні цитогенетичні дослідження проведено під час встановлення діагнозу та виявлено нормальний каріотип без цитогенетично видимих змін. Однак у хворого з ГПЛ (варіант М3) дослідження FISH показало наявність химерного гена *PML/RARA* у 97 % проаналізованих клітин, що свідчило про наявність транслокації  $t(15;17)(q22;q11-21)$ , яка є діагностичною (маркерною) перебудовою при ГПЛ і спостерігається у 91–95 % хворих [3]. Наступні цитогенетичні дослідження у цих хворих проведено під час рецидиву хвороби та відзначено наявність аналогічного результату: при аналізі каріотипу виявлено нормальний набір хромосом, однак у хворого з ГПЛ дослідження FISH показало наявність химерного гена *PML/RARA* у 92,5 % проаналізованих клітин.

У групі хворих на ГЛЛ (5 пацієнтів з В-клітинною та 2 пацієнти з Т-клітинною) цитогенетичні дослідження проведено на різних етапах перебігу ГЛЛ: під час встановлення діагнозу, під час рецидиву та в період ремісії. Під час встановлення діагнозу у 2 первинних пацієнтів з В-клітинною ГЛЛ виявлено по одній перебудові в каріотипі. У однієї хворої (№ 3) це була філадельфійська хромосома (Ph), виявлена у всіх проаналізованих клітинах і утворена внаслідок транслокації  $t(9;22)(q34;q11)$ , наявність фузійного гена *BCR/ABL* підтверджено дослідженням FISH. Ph-хромосома діагностична (маркерна) перебудова при хронічній мієлоїдній лейкемії (ХМЛ), проте спостерігається і у 15–30 % хворих на ГЛЛ [2, 3]. Наступне цитогенетичне дослідження у цієї пацієнтки проведено під час рецидиву хвороби та відзначено наявність Ph-хромосоми у 33 % проаналізованих клітин, тобто клональної еволюції у цієї хворої не відзначено. В іншій хворій (№ 4) виявлено ізохромосому  $7-i(7)(q10)$  у 70 % проаналізованих клітин. Під час рецидиву лейкемії у згаданій пацієнтки виявлено клональну еволюцію у вигляді появи нового субкласу клітин із гіпердиплоїдним набором хромосом (54–55 хромосом), трисомією 2, 6, 8, 10, 11, 12, 17, 18 та 21 у 36 % проаналізованих клітин.

Під час першого рецидиву хвороби у 3 пацієнтів з В-клітинною ГЛЛ, які до рецидиву перебували в довготривалій повній ремісії, виявлено: у 2 випадках (№ 5 та № 6) – нормальний каріотип без цитогенетично видимих змін, в 1 випадку (№ 7) – масивну гіпердиплоїдію у 14 % проаналізованих клітин (60–61 хромосом, трисомії X, 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 21 та додаткова маркерна хромосома (+mar) невстановленого походження). Наступні цитогенетичні дослідження у цих хворих проведено під час ремісії хвороби й у всіх виявлено нормальний каріотип без цитогенетичних перебудов у 100 % проаналізованих клітин. Під час другого рецидиву у вищезгаданих пацієнтів відзначено наявність аналогічного результату, як при першому обстеженні: у 2 випадках виявлено нормальний каріотип, у 1 випадку – масивну гіпердиплоїдію в 15 % проаналізованих клітин.

У однієї пацієнтки з Т-клітинною ГЛЛ (№ 8) було проведено 6 цитогенетичних обстежень. Первинне цитогенетичне дослідження виконано під час першого рецидиву після короткотривалої ремісії, яке показало наявність у каріотипі хворої двох копій Ph-хромосоми та трисомії 8 (+8) у 45 % проаналізованих клітин. Під час другого рецидиву у цієї хворої виявлено клональну еволюцію у вигляді появи, крім двох копій Ph та +8, додаткових структурних і кількісних хромосомних аномалій у 75 % проаналізованих клітин, а саме: трисомій 1, 3, 6, додаткової маркерної хромосоми (+mar) невстановленого походження, термінальної делеції довгого плеча 1 хромосоми ( $del(1)(q24)$ ) та ще однієї додаткової копії Ph. Під час третього рецидиву у зв'язку з відсутністю метафазних пластинок у дослідному матеріалі проведено лише дослідження FISH, яке показало наявність 15 % Ph-позитивних клітин. Під час четвертого рецидиву у хворої під час аналізу каріотипу виявлено дві копії Ph-хромосоми, трисомії 1 та 8, делецію  $del(1)(q24)$  та маркерну хромосому невстановле-

ного походження у 23 % проаналізованих клітин. Ще два цитогенетичні обстеження у цієї хворої було проведено у період ремісії та виявлено нормальний набір хромосом, а відсутність химерного гена *BCR/ABL* підтверджено дослідженням FISH.

Ще у одного хворого на Т-клітинну ГЛЛ (№ 9) первинне цитогенетичне дослідження проведено під час ремісії хвороби, яке показало наявність нормального каріотипу без хромосомних змін. Наступне цитогенетичне дослідження у цього хворого проведено під час першого рецидиву та виявлено такі перебудови каріотипу:  $der(17)t(17;?)(p11;?)$ , моносомію 18 хромосоми (-18) та 1–2 додаткові маркерні хромосоми невстановленого походження у 70 % проаналізованих клітин.

У пацієнтів із білінійною ГЛ (2 хворих на В-клітинну ГЛЛ з мієлоїдними маркерами) первинні цитогенетичні дослідження проведено під час встановлення діагнозу та виявлено аномальний каріотип. У одного хворого (№ 10) в усіх проаналізованих клітинах встановлено наявність Ph-хромосоми та трисомії 21. У іншого хворого (№ 11) у 25 % проаналізованих клітин виявлено транслокацію  $t(8;21)(q22;q22)$ , яка найчастіше (у 40 % хворих) спостерігається при ГМЛ з дозріванням (варіант М2 за FAB-класифікацією) [3]. Також у цього пацієнта, крім  $t(8;21)(q22;q22)$ , виявлено додаткову перебудову – термінальну делецію довгого плеча 9 хромосоми ( $del(9)(q21-q22)$ ). Наступні цитогенетичні дослідження у цих хворих проведено під час рецидиву хвороби та виявлено клональну еволюцію у вигляді появи додаткових аномалій і нових субклонів клітин.

Таким чином, загалом було проведено 29 цитогенетичних (аналіз каріотипу) та 6 молекулярно-цитогенетичних досліджень (FISH) бластних клітин 11 хворих на різних етапах перебігу ГЛ: під час встановлення діагнозу, під час ремісії хвороби та у разі рецидиву. Зазвичай під час цитогенетичного аналізу клітин КМ хворих на ГЛ, крім аномального клону клітин, переважно також виявляють і клон клітин із нормальним каріотипом, причому відсоток аномальних клітин зазвичай корелює з відсотком бластів у КМ, що спостерігалось і в нашому дослідженні. Під час дослідження клітин ПК такої кореляції не виявлено.

Загалом, було виявлено такі діагностичні (маркерні) аномалії – транслокації  $t(15;17)(q22;q11-21)$ ,  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $t(9;22)(q34;q11)$  та/або відповідні фузійні гени *PML/RARa*, *AML1/ETO*, *BCR/ABL* і підтверджено підтип ГЛ відповідно до класифікації BOO3, 2016 [5, 16].

Химерний ген *PML/RARa* виявлено в одного хворого (№ 2) (рис. 1), однак під час аналізу каріотипу цитогенетично видимих змін у цього пацієнта не спостерігали. Транслокація  $t(15;17)(q22;q11-21)$  та відповідний химерний ген *PML/RARa* строго специфічні для ГПЛ (М3 варіант ГМЛ за FAB класифікацією), їх виявляють у 91–95 % усіх хворих. Утворення химерного гена *PML/RARa* та відповідного химерного білка *PML/RARa* відіграє ключову роль у патогенезі ГПЛ. Унаслідок цього зупиняється нормальне дозрівання промієлоцитів. У 29–37 % випадків, крім  $t(15;17)(q22;q11-21)$ , спостерігають додаткові хромосомні аномалії, а саме – трисомію 8,  $del(9q)$ , ізодериват хромосоми 17. Описано, що наявність таких додаткових аномалій, як трисомія 8 та ізодериват 17 хромосоми, на прогноз перебігу хвороби не впливає, тоді як  $del(9q)$  – погіршує прогноз [3, 4, 18].

Транслокацію  $t(8;21)(q22;q22)$  виявлено в одного хворого (№ 11) (рис. 2). Цю перебудову знаходять у 7 % випадків ГМЛ і у 40 % пацієнтів з М2 варіантом ГМЛ. Унаслідок вказаної транслокації утворюється химерний ген *AML1/ETO* й відповідний химерний білок *AML1/ETO*, який блокує процес транскрипції та зупиняє нормальне дозрівання клітин. У 40 % випадків, крім  $t(8;21)(q22;q22)$ , спостерігають додаткові аномалії, а саме – втрату X- або Y-хромосоми, делецію довгого плеча 9 хромосоми  $del(9q)$ , додаткові копії хромосом 8

і 21 та ін. [3, 10]. Так, у нашому випадку, окрім  $t(8;21)(q22;q22)$ , ми спостерігали додаткову аномалію – делецію довгого плеча 9 хромосоми  $del(9)(q21-22)$  (рис. 2). За повідомленнями літератури, відсутність Y-хромосоми не впливає на прогноз перебігу захворювання. У групі хворих з делецією  $del(9q)$  відзначено збільшену у 2 рази частоту рецидивів [3, 10].

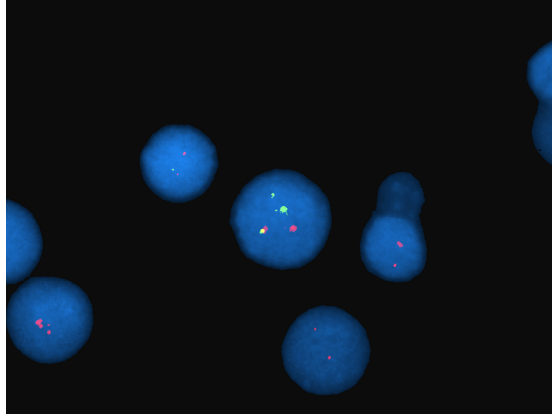
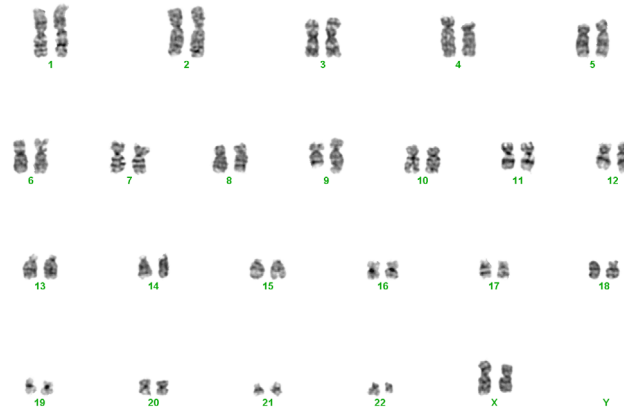


Рис. 1. Результат FISH-аналізу на інтерфазних ядрах для виявлення гена *PML/RARα* із застосуванням флуоресцентної мітки *PML/RARα DC SF* (Cytocell) у хворого № 2



Рис. 2. Транслокація  $t(8;21)(q22;q22)$ , делеція  $del(9)(q21-22)$  у хворого № 11

Філадельфійську хромосому (Ph), утворену внаслідок транслокації  $t(9;22)(q34;q11)$ , виявлено у 3 пацієнтів (№№ 3, 8, 10) (рис. 3). Ця аномалія спостерігається у 15–30 % хворих на ГЛЛ та у 2–3 % хворих на ГМЛ, вона характерна і для біфенотипових ГЛ. У результаті цієї аберації утворюється химерний ген *BCR/ABL*, білковий продукт якого характеризується сильною тирозинкіназною активністю й відіграє ключову роль у патогенезі, як і ХМЛ, так і Ph-позитивних ГЛ [2]. У 50 % хворих, крім  $t(9;22)(q34;q11)$ , виявляють додаткові перебудови каріотипу –  $del(22q)$ ,  $-7$ ,  $del(7q)$ ,  $+8$  та інші [2, 3, 19]. Так, у 2 із 3 обстежених пацієнтів з Ph-позитивними ГЛ ми спостерігали додаткові аномалії різного характеру – трисомії 8 та 21, додаткові копії Ph. У хворій № 8 з Ph-позитивною ГЛЛ під час повторного цитогенетичного дослідження в ході рецидиву хвороби було виявлено Ph-позитивний клон клітин із множинними структурними та кількісними перебудовами каріотипу, що свідчить про клональну еволюцію та прогресію хвороби.

Рис. 2. Транслокація  $t(9;22)(q34;q11)$  у хворі № 3

З урахуванням виявлених цитогенетичних маркерів хворих на ГЛ класифіковано на групи ризику відповідно до рекомендацій European LeukemiaNet [7, 12, 15]: група хворих з несприятливими цитогенетичними маркерами, група проміжного ризику без прогностично значущих маркерів і група зі сприятливими факторами прогнозу (табл. 2).

Таблиця 2

Розподіл пацієнтів з ГЛ на групи ризику відповідно до виявлених цитогенетичних маркерів

Гостра мієлоїдна лейкемія	Гостра лімфобластна лейкемія
Прогностично несприятливі аберації:	
перебудови 3q, 17p, -5/del(5q), -7/del(7q), $t(v;11)(v;q23)$ , $t(6;9)(p23;q34)$ , $t(9;22)(q34;q11)$ , моносомний каріотип, комплексний каріотип ( $\geq 3$ аномалій)	$t(4;11)(q21;q23)$ , $t(9;22)(q34;q11)$ , гіподиплоїдний набір хромосом (26-44), комплексний каріотип ( $\geq 3$ аномалій)
Аберації з проміжним прогнозом:	
рідкісні або нетипові аномалії, нормальний каріотип	рідкісні або нетипові аномалії, нормальний каріотип
Прогностично сприятливі аберації:	
$t(8;21)(q22;q22)$ , $t(15;17)(q22;q11-21)$ , $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$	$t(12;21)(p13;q22)$ , масивна гіпердиплоїдія ( $>50$ хромосом)

До першої групи хворих із несприятливими цитогенетичними маркерами включено 4 випадки ГЛ з  $t(9;22)(q34;q11)$  та/або відповідним химерним геном *BCR/ABL*, перебудовами 17p, множинними кількісними і структурними аномаліями каріотипу (№№ 3, 8, 9, 10). Загалом, несприятливими прогностичними чинниками вважають транслокації  $t(v;11)(v;q23)$ ,  $t(6;9)(p23;q34)$ ,  $t(9;22)(q34;q11)$ , моносомії 5 і 7, делеції 5q і 7q, перебудови 3q, 17p, моносомний каріотип (відсутність двох чи більшої кількості автосом або ж відсутність однієї автосоми у поєднанні хоча б з однією структурною перебудовою) та інші при ГМЛ; гіподиплоїдію (24-44 хромосом), транслокації  $t(9;22)(q34;q11)$ ,  $t(4;11)(q21;q23)$ , перебудови 17p та інші при ГЛЛ; а також наявність двох і більше клонів патологічних клітин, каріотипи із множинними хромосомними абераціями при усіх типах ГЛ (табл. 2). Зазвичай пацієнти з такими змінами погано відповідають на лікування або не відповідають узагалі, тривалість їхнього життя значно скорочується, а якість погіршується [3, 7, 12, 15].

До другої групи хворих з маркерами проміжного прогнозу включено 4 випадки ГЛ із рідкісними або нетиповими хромосомними перебудовами ( $i(7)(q10)$ ) та з нормальним



каріотипом (№№ 1, 4, 5, 6). Відомості літератури щодо прогностичного значення нормального каріотипу та рідкісних перебудов у хворих на ГЛ суперечливі. Результати лікування цих хворих значно відрізняються один від одного, тому ця проблема потребує подальшого вивчення. До прикладу, у хворих на ГМЛ із нормальним каріотипом виявлення мутацій генів *RUNX1*, *FLT3*, *RAS*, *c-KIT*, тандемних повторів гена *MLL* змінюють прогноз хвороби із проміжного на несприятливий, а наявність мутацій гена *CEBRA*, *NPM1* – визначає чутливість до хіміотерапії та відносно сприятливий прогноз [3, 7, 12, 15].

До останньої групи включено 3 хворих із прогностично сприятливими цитогенетичними маркерами – випадки масивної гіпердиплоїдії при ГЛЛ, транслокації  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $t(15;17)(q22;q11-21)$  та/або відповідні химерні гени *AML1/ETO*, *PML/RARa* при ГМЛ (№№ 2, 7, 11). Загалом, сприятливими прогностичними чинниками вважають  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $t(15;17)(q22;q11-21)$ ,  $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$  при ГМЛ;  $t(12;21)(p13;q22)$ , масивну гіпердиплоїдію (>50 хромосом) при ГЛЛ (табл. 2) [3, 7, 12, 15].

Розподіл хворих на групи ризику відповідно до виявлених прогностичних маркерів дав змогу підібрати оптимальну тактику їхнього лікування, а саме: інтенсивність терапії, необхідність проведення трансплантації кісткового мозку вже у ремісії I, доцільність призначення інгібіторів тирозинкінази при ГЛ з  $t(9;22)(q34;q11)$  або диференціувального агента – повної транс-ретиноївої кислоти (АТРА) при ГМЛ з  $t(15;17)(q22;q11-21)$ . Застосування препаратів цільової дії (АТРА й інгібіторів тирозинкінази) у лікуванні хворих на ГЛ значно покращило його результат.

Цитогенетичні та молекулярно-генетичні дослідження лейкемічних клітин у хворих необхідно проводити на всіх етапах перебігу ГЛ: під час встановлення діагнозу, під час ремісії хвороби та у разі рецидиву. Цитогенетичні дослідження дали змогу виявити асоційовані з ГЛ аномалії-маркери, наприклад,  $t(15;17)(q22;q11-21)$  при ГЛЛ,  $t(8;21)(q22;q22)$  при ГМЛ М2,  $t(9;22)(q34;q11)$  при ГЛЛ та інші. Деякі з них можуть бути одночасно і діагностичними, і прогностичними маркерами. З урахуванням виявлених маркерів хворих класифіковано на групи ризику: група високого ризику з несприятливими цитогенетичними маркерами, група середнього ризику без прогностично значущих маркерів і група зі сприятливими факторами прогнозу. Розподіл пацієнтів із ГЛ на прогностичні групи дав змогу підібрати оптимальну тактику їхнього лікування. За допомогою цитогенетичних і молекулярно-генетичних методів також можна оцінити повноту ремісії та мінімальну залишкову хворобу. Таким чином, цитогенетичні та молекулярно-генетичні методи мають бути включені у стандарти обстеження хворих не тільки з ГЛ, а й з усіма гематологічними неоплазіями.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева С. В., Дроздова В. Д. Стандарти аналізу препаратів хромосом при неоплазіях кровотворення: метод. рекомендації. К., 2007. 44 с.
2. Зотова Е. В., Лукьянова А. С., Вальчук М. А. и др. Диагностическое и прогностическое значение филадельфийской хромосомы у пациентов с острыми лейкозами // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. 2019. Т. 1. № 2. С. 18–29.
3. Ольшанская Ю. В., Домрачева Е. В. Хромосомные перестройки при острых лейкозах. М.: МЕДпресс-информ, 2006. 112 с.
4. Andersen M. K., Larson R. A., Mauritzson N. et al. Balanced chromosome abnormalities  $inv(16)$  and  $t(15;17)$  in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: report from an International Workshop. Gen. Chromosom // Cancer. 2002. Vol. 33. N 4. P. 395–400.

5. *Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R.* et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia // *Blood*. 2016. Vol. 127. N 20. P. 2391–2405.
6. *Bain B. J.* Leukaemia diagnosis. 4th ed. NJ: Wiley-Blackwell, 2010. 403 p.
7. *Haferlach C., Rieder H., Lillington D. M.* et al. Proposals for standardized protocols for cytogenetic analyses of acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes // *Genes Chromosomes Cancer*. 2007. Vol. 46. N 5. P. 494–499.
8. *Heim S., Mitelman F.* Cancer cytogenetic. 3rd ed. NY: Wiley-Blackwell, 2009. 736 p.
9. *Jongen-Lavrencic M., Grob T., Hanekamp D.* et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia // *N. Engl. J. Med.* 2018. Vol. 378. N 13. P. 1189–1199.
10. *Linggi B., Muller-Tidow C., van de Locht L.* et al. The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, specifically represses the transcription of the p14ARF tumor suppressor in acute myeloid leukemia // *Nature Medicine*. 2002. Vol. 8. N 7. P. 743–750.
11. *McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M.* ISCN, 2016. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger, 2016. 140 p.
12. *Mrózek K., Marcucci G., Nicolet D.* et al. Prognostic significance of the European Leukemia-Net standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia // *J. Clin. Oncol.* 2012. Vol. 30. P. 4515–4523.
13. *Pienkowska-Grela B., Brycz-Witkowska J., Chmarzynska-Mróz E.* i wsp. Analiza cytogenetyczna w nowotworach hematologicznych: Poradnik // Warszawa: Centrum Onkologii, 2004. 59 s.
14. *Pinkel D., Straume T., Gray J. W.* Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1986. Vol. 83. N 9. P. 2934–2938.
15. *Rack K. A., van den Berg E., Haferlach C.* Cytogenetics and molecular genetics European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms // *Leukemia*. 2019.
16. *Swerdlow S. H., Campo E., Pileri S. A.* et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms // *Blood*. 2016. Vol. 127. N 20. P. 2375–2390.
17. *Van Dongen, Van der Velden V. H., Bruggemann M.* et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies // *Blood*. 2015. Vol. 125. N 26. P. 3996–4009.
18. *Vasquez-Palacio G., Botero O., Sierra M.* et al. Cytogenetic analysis and FISH of terminal deletion of the long arm of chromosome 9 in a patient with acute promyelocytic leukemia // *Medicina Universitaria*. 2009. Vol. 11. N 44. P. 193–197.
19. *Wetzler M., Dodge R. K., Mrózek K.* et al. Additional cytogenetic abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: A study of the Cancer and Leukaemia Group B // *Br. J. Haematol.* 2004. Vol. 124. N 3. P. 275–288.

Стаття надійшла до редакції 30.05.19

доопрацьована 29.07.19

прийнята до друку 03.09.19

**CYTOGENETIC INVESTIGATIONS OF LEUKEMIC CELLS  
AT DIFFERENT STAGES OF ACUTE LEUKEMIA**

**O. Zotova<sup>1</sup>, A. Lukianova<sup>2</sup>, M. Valchuk<sup>1</sup>, Y. Karol<sup>3</sup>, N. Horon<sup>3</sup>,  
O. Shalay<sup>1</sup>, V. Loginsky<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine, NAMS of Ukraine»  
45, General Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine*

*<sup>2</sup>Medical Biology Centre «Genom»  
23, Kopernik St., Kyiv 04216, Ukraine*

*<sup>3</sup>5th Clinical City Hospital  
45, General Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine  
e-mail: lnkzotova@gmail.com*

Cytogenetic investigations of bone marrow (BM) and/or peripheral blood (PB) cells from 11 patients (range: 18–47 years, 6 males and 5 females) were performed at different stages of acute leukemia (AL): in newly diagnosed patients, in remission and at relapse. The methods of conventional cytogenetics (GTG) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were used. Cytogenetic methods were performed using standard techniques and karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2016). Structural (del(1)(q24), i(7)(q10), t(8;21)(q22;q22), del(9)(q21-q22), t(9;22)(q34;q11), t(15;17)(q22;q11-21), der(17)t(17;?)(p11;?), marker chromosomes) and numerical (trisomies, monosomies) chromosomal abnormalities were found. Some genetic abnormalities (BCR/ABL and PML/RARA fusion genes) were detected by molecular genetic methods (FISH). Spectrum of cytogenetic abnormalities had an important diagnostic and prognostic significance. Diagnosis of AL is possible due to the presence of specific genetic markers that can confirm some types of AL, namely t(8;21)(q22;q22) detect in patients with acute myeloid leukemia M2 (AML M2), t(15;17)(q22;q11-21) – in patients with acute promyelocytic leukemia (APL), t(9;22)(q34;q11) – in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Taking into consideration the identified cytogenetic abnormalities AL patients were classified by risk groups: the group of patients with adverse prognosis factors, the intermediate-risk group without significant prognostic markers and the group of patients with favorable cytogenetic markers. Distribution of patients into risk groups according to the identified prognostic markers allows to choose the most appropriate treatment approach for them, namely the intensity of therapy, the necessity of bone marrow transplantation in the first remission, the necessity of the prescription of tyrosine kinase inhibitors for patients with AL with t(9;22)(q34;q11) or differentiating agent – all-trans retinoic acid (ATRA) for patients with AML with t(15;17)(q22;q11-21). Thus, cytogenetic investigations should be included in the standard examination of patients with AL for diagnosis, prognosis and selection the optimal treatment strategy. Besides the analysis of differential banding pattern chromosomes it is necessary for patients with AL to apply molecular genetic studies, namely FISH and polymerase chain reaction (PCR).

*Keywords:* acute leukemia, karyotype, cytogenetic abnormalities, diagnosis, prognosis