

Х.Я. Каримов, К.Т. Бобоев, Б.Р. Алланазарова, Ю.Ю. Ассесорова

Случай вариантной транслокации $t(3;9;22)(p24;q34;q11)$ при хроническом миелоидном лейкозе

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент

В данной работе представлен случай хронического миелоидного лейкоза с неизвестной ранее вариантной транслокацией $t(3;9;22)(p24;q34;q11)$, выявленной цитогенетическим исследованием с использованием методики GTG-бендинга. Несмотря на отсутствие классической филадельфийской хромосомы, наличие дериватов хромосом 9 и 22, а также слитного гена *BCR-ABL* позволяют считать данную транслокацию патогенетической для ХМЛ. Хороший ответ больного на терапию гливекком говорит об отсутствии неблагоприятного воздействия на патогенез заболевания дополнительного генетического локуса (3p24), вовлеченного в комплексную перестройку.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз; Ph-хромосома; вариантная транслокация

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) – это клональное изменение плюропотентных стволовых клеток, дифференцирующихся в миелопролиферативном направлении [3, 4]. Заболеваемость ХМЛ в мире на протяжении последних десятилетий составляет 1-2 случая на 100000 населения [7]. В целом, количество больных ХМЛ составляет около 15% от общего числа больных лейкозами. Чаще заболевают лица в возрасте от 30 до 50 лет с соотношением мужчин и женщин 1,6:1 [1]. Причиной возникновения ХМЛ является реципрокная транслокация между хромосомами 9 и 22 – $t(9;22)(q34;q11)$. В результате данной межхромосомной перестройки происходит рекомбинация генов *BCR* (break-point cluster region) и *ABL* (Abelson) с формированием слитного гена *BCR-ABL*, который продуцирует химерный белок с измененной тиразинкиназной активностью [3, 8].

В 90-95% случаев классическая транслокация $t(9;22)(q34;q11)$ приводит к образованию филадельфийской хромосомы (Ph), выявляемой в кариотипе больных. Однако у 5-8% больных ХМЛ могут наблюдаться вариантные или комплексные транслокации, включающие в реаранжировку кроме 9-ой и 22-ой, одну или более дополнительные хромосомы [2, 5]. По данным литературы, самыми вовлекаемыми в комплексные перестройки с участием хромосомных ло-

кусов 9q34 и 22q11.2 являются регионы 1p36, 3p21, 5q31, 6p21, 9q22, 10q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12 и 22q13 [1, 6]. Предполагается, что в происхождении вариантных перестроек с участием хромосом 9 и 22 могут иметь место как несколько последовательных транслокаций, так и единственное одновременное событие – синхронный перенос генетического материала в три и более локуса [5].

При вариантной транслокации месторасположением слитного гена *BCR-ABL* чаще всего является хромосома 22 (22q11.2), но в редких случаях перемещение или инсерция слитного гена *BCR-ABL* происходит и в другие регионы. Как правило, сегмент 22q11-qter перемещается на третью хромосому, в то время как часть третьей хромосомы транслоцируется на 9q34. Реже слитный ген *BCR-ABL* может быть расположен в регионе 9q34 [1, 6]. Были описаны случаи, когда слитный ген *BCR-ABL* одновременно располагался и на 9-ой, и на 22-ой хромосоме [4].

В большинстве случаев вариантные транслокации – $t(V;9;22)$ – обнаруживаются стандартным цитогенетическим методом. При некоторых вариантных транслокациях дополнительный материал, переносимый на Ph-хромосому, маскирует её, тогда как у других пациентов обнаруживается классическая Ph-хромосома и атипичный дериват хромосомы 9 [5]. Дериватная (der) хромосома 9, участвующая в перестройке, встречается у 10-15% пациентов [1, 6]. Доля участия в комплексной реаранжировке других хромосом в настоящее время не установлена в виду редкой встречаемости каждого случая вариантной транслокации.

Как правило, вариантные транслокации выявляются в дебюте заболевания. Считается, что в отличие от дополнительных перестроек, возникающих по мере прогрессии ХМЛ, вариантные транслокации с участием хромосом 9 и 22 не являются предикторами прогрессии заболевания [1].

В настоящем исследовании нами представлен случай хронического миелоидного лейкоза с новой вариантной транслокацией $t(3;9;22)(p24;q34;q11)$.

Материалы и методы

Объектом исследования стал костный мозг больного Х., 31 год, которому в сентябре 2016 г. в НИИ Гематологии и Переливания крови МЗ РУз (НИИГ и ПК, Ташкент) был поставлен диагноз хронический миелоидный лейкоз. Хромосомный анализ проводили методом стандартного цитогенетического исследования (СЦИ), (GTG-бендинг, 350 сегментов на кариотип). Культивирование ядерных клеток костного мозга проводили в краткосрочной культуре (24 часа) при температуре 37°C на питательной среде, содержащей RPMI-1640 с глутамином и 20% телячьей эмбриональной сыворотки. Остановку клеточного деления на стадии метафазы производили с помощью колхицина (0,01%), который вносили в среду в количестве 4 мкл при посадке. Гипогонизацию клеток раствором хлорида калия (0,55%) проводили в течении 25 минут при температуре 37°C. Фиксацию клеток осуществляли трехкратным проведением через охлажденный до -4°C фиксатор (этанол/ледяная уксусная кислота – 2,5:1). Хромосомные препараты готовили расщеплением суспензии ядерных фрагментов клеток на влажные охлажденные предметные стекла. Полученные препараты высушивали при температуре 25°C, окрашивали по методу Гимза с предварительной обработкой 0,25%-ным раствором трипсина и микроскопировали (микроскоп AXIO Scope.A1, Zeiss). Поиск метафаз осуществляли при увеличении $\times 200$ (окуляры PI 10x/23 Zeiss, объектив EC Plan-NEOFLUAR 20x/05 Ph2 $\infty/0,17$), анализ метафазных пластинок – при увеличении $\times 1000$ (окуляры PI 10x/23 Zeiss, объектив C Plan-NEOFLUAR 100x/1,3 Oil $\infty/0,17$). Всего было проанализировано 40 метафазных пластинок. Идентификацию хромосом проводили в соответствии с международной системой цитогенетической номенклатуры ISCN 2009 [9].

Молекулярно-генетическое исследование проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью системы детекции продуктов Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия). Для анализа экспрессии гена *BCR-ABL* использовали набор реагентов «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT». Определение интенсивности экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL* и контрольного гена *ABL* проводили согласно протоколу производителя. Метод не стандартизирован по международной шкале (IS), результаты анализа уровня экспрессии представлены в процентах.

Результаты и обсуждение

Клиническое наблюдение. Отдельные симптомы заболевания ощущались больным Х. на протяжении нескольких месяцев до обращения в НИИГиПК МЗ РУз. При поступлении в специализированное медицинское учреждение больной жаловался на общую слабость, головные боли, чувство нехватки воздуха, повышение температуры тела, боли в правом подреберье, боли в костях, тошноту, отсутствие аппетита, тяжесть и боль в абдоминальной области. При физикальном обследовании отмечалась гепатоспленомегалия. Общий анализ крови пациента при поступлении в гематологическое отделение института показал: гемоглобин — 96 г/л, эритроциты — $3,2 \cdot 10^{12}/л$, цветной показатель — 0,9, тромбоциты — $100,0 \cdot 10^9/л$, лейкоциты — $111,0 \cdot 10^9/л$, бласты – 2%, миелобласты — 12%, метамиелобласты — 10%, промиелоциты – 5%,

палочкоядерные клетки — 6%, сегментоядерные клетки — 60%, эозинофилы — 11%, лимфоциты — 3%, моноциты — 1%, СОЭ — 15 мм/ч. При первичной диагностике больному также были выполнены морфологическое исследование костного мозга, коагулограмма, биохимический анализ, молекулярно-генетическое исследование и кариотипирование. Назначенная пациенту терапия включала гидреа, аллопуринол, нистатин, водно-солевую нагрузку, а также глибек Novartis (400 mg).

Цитогенетический анализ кариотипа клеток костного мозга больного Х., выполненный при первичной диагностике, не выявил присутствия классической Ph-хромосомы. Однако в 100% метафазных пластинок были обнаружены три хромосомных деривата, один из которых был идентифицирован как der(3) с отсутствием дистального фрагмента р-плеча, другой – как der(9) с добавочным фрагментом в дистальной области q-плеча, третий – как der(22) с добавочным фрагментом в дистальной области q-плеча (рис. 1).

Относительный размер длины р- и q-плечей дериватов 3-й, 9-й и 22-й хромосом и их гомологов, не затронутых перестройкой, размер транслоцированного фрагмента, а также расположение бендов позволили определить цитогенетические регионы разрывов. Место поломки на 3-й хромосоме располагалось в области крупного темноокрашенного бенда на коротком плече, идентифицируемом по системе ISCN 2013 как локус 3p24. На хромосоме 9 добавочный эухроматиновый фрагмент визуализировался в области 9q34, а на хромосоме 22 добавочный гетерохроматиновый фрагмент – в области 22q11. Анализ метафазных пластинок с помощью программы ВидеоТест-Карио 3.1 подтвердил наличие цитогенетической перестройки с вовлечением 3-й, 9-й и 22-й хромосом (рис. 2). Наличие патогенетической транслокации, приводящей к образованию химерного гена *BCR-ABL*, было подтверждено молекулярно-генетическим исследованием, проведенном при диагностике заболевания. Исследование показало, что уровень транскриптов РНК слитного гена *BCR-ABL* составил 66%. После стабилизации состояния больной был выписан под наблюдение участкового терапевта и гематолога по месту жительства с дальнейшим контролем гемограммы и уровня экспрессии *BCR-ABL* (мониторинговые исследования). Контрольный анализ ПЦР, проведенный через год после назначения глибека, выявил изменение объема экспрессии мутированного гена, которая достигла значения 0,076%.

Таким образом, хромосомный анализ костного мозга больного Х., выполненный методом СЦИ, позволил обнаружить в кариотипе паци-

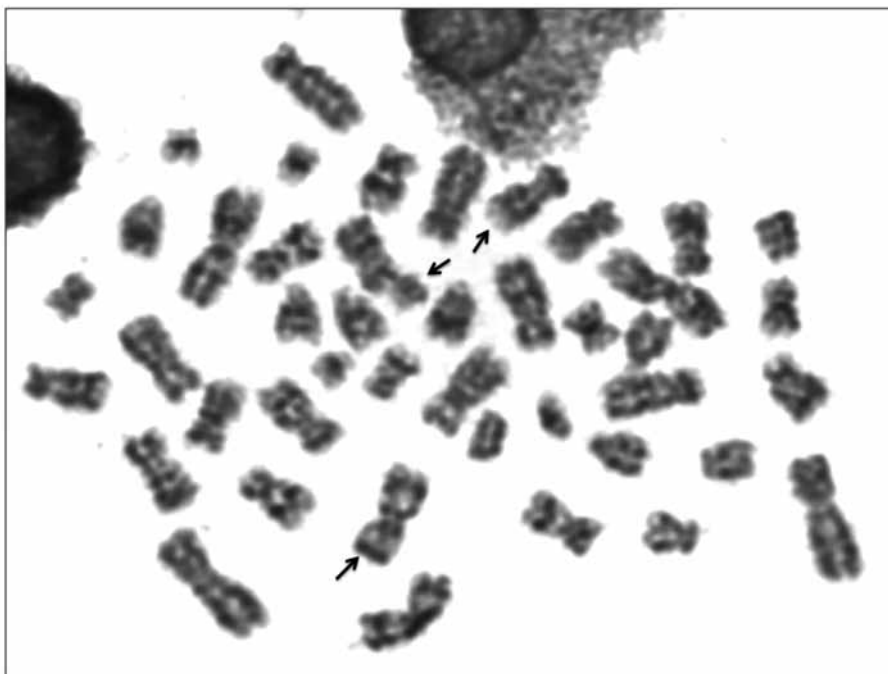


Рис. 1. Кариотип больного ХМЛ с тремя дериватными хромосомами. Дериваты хромосом, вовлеченных в перестройку, обозначены стрелками. (Увеличение x1000. GTG-окрашивание, 350 сегментов на кариотип)

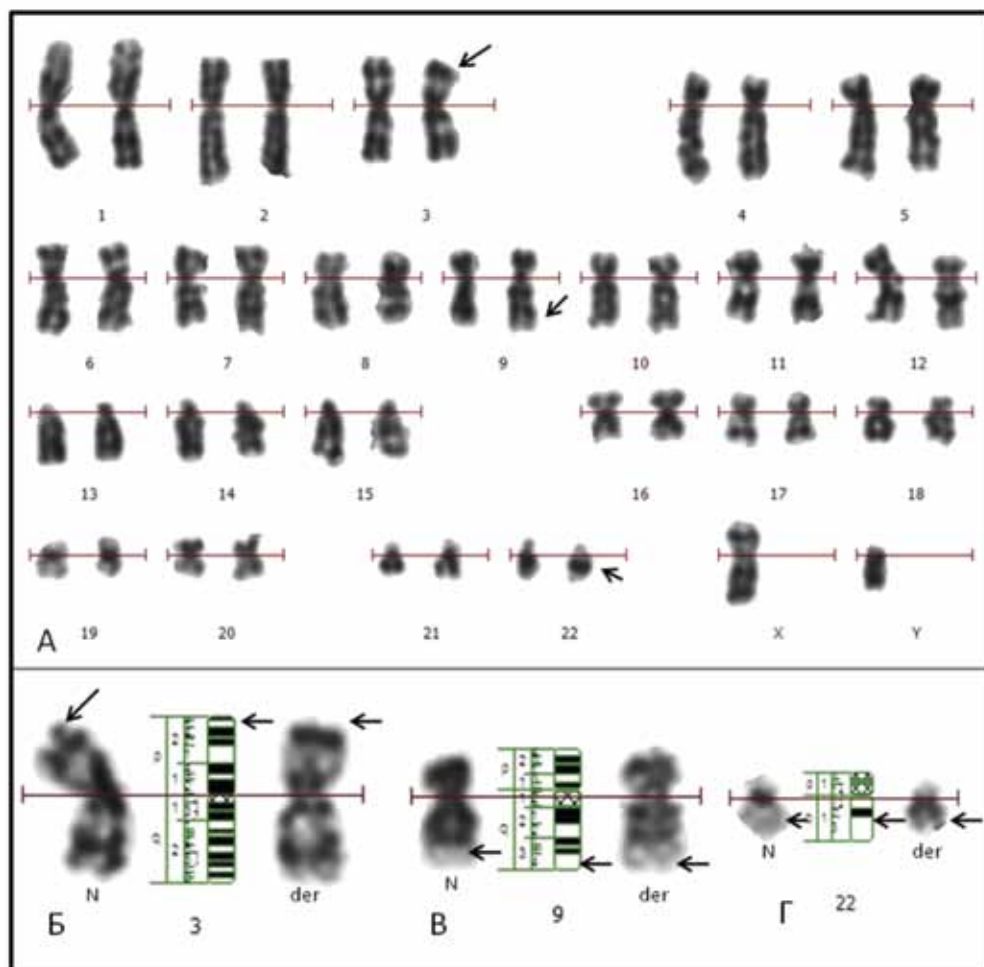


Рис. 2. А. Идеограмма, выполненная с помощью программы ВидеоТест-Карио 3.1. Вовлеченные в перестройку хромосомы и их дериваты обозначены стрелками. Б, В, Г. Увеличенные нормальные и дериватные хромосомы 3, 9 и 22. Стрелками указаны локусы разрывов хромосом. (Увеличение x1000. GTG-окрашивание, 350 сегментов на кариотип)

ента с ХМЛ вариантную транслокацию t(3;9;22)(p24;q34;q11). До настоящего времени комплексная перестройка с вовлечением локусов 3p24, 9q34 и 22q11 не была описана в литературе.

Стандартное цитогенетическое исследование позволяет отнести больных с патогенетической для ХМЛ транслокацией к одной из трёх групп: 1) группа больных с классической Ph-хромосомой, образующейся в результате обмена фрагментами между хромосомами 9 и 22 – t(9;22)(q34;q11); 2) группа больных с цитогенетически определяемой Ph-хромосомой, образующейся при вариантной транслокации t(V;9;22), где «V» представлена третьей вовлеченной хромосомой, 3) группа больных с вариантной транслокацией t(V;9;22) без цитогенетически детектируемой Ph-хромосомы. В описываемом нами случае изменение хромосомы 22, приводящее к цитогенетически визуализируемому проявлению патогенетической реаранжировки – Ph-хромосоме, было замаскировано фрагментом дополнительно вовлеченной хромосомы 3. В результате дериват 22-ой хромосомы практически не отличался по размеру от неизменной хромосомы 22. Однако, в той области хромосомы 22, где в норме расположен эухроматиновый регион (22q11), в нашем случае визуализировался темно окрашенный бенд, что и позволило определить изменение данной хромосомы. Это изменение было выявлено благодаря GTG-бендингу и осталось бы незамеченным при рутинном окрашивании хромосом. Описываемое нами изменение хромосомы 22 позволяет установить её вовлеченность в транслокацию, однако данный дериват не может считаться классической филадельфийской хромосомой. Следовательно, больного с данной перестройкой можно было бы отнести к четвертой группе больных – с вариантной транслокацией t(V;9;22;), Ph-отрицательных, но с цитогенетически детектируемым в кариотипе der22.

Как правило, Ph-отрицательных/*BCR-ABL*-положительных пациентов с ХМЛ хорошо отвечает на таргетную терапию ингибиторами тирозинкиназ, достигая цитогенетического и молекулярного ответа в том же объеме, как и Ph-положительные пациенты [4]. У пациента с описываемой нами перестройкой контрольная гемограмма месяц спустя после назначения гливека показала: гемоглобин — 108,0 г/л, эритроциты — $4,0 \cdot 10^{12}/л$, цветной показатель — 0,8, тромбоциты — $208,0 \cdot 10^9/л$, лейкоциты — $5,6 \cdot 10^9/л$, палочкоядерные клетки — 1%, сегментоядерные — 74%, базофилы — 1%, лимфоциты — 25%, моноциты — 4%, СОЭ — 5 мм/ч. Показатели общего анализа крови, повторяемого ежемесячно на протяжении года, свидетельствовали о стабильном состоянии больного. Мониторинговая оценка экспрессии *BCR-ABL* выявила,

что через год после назначения гливека уровень транскриптов РНК слитного гена снизился в 868,4 раза и составил 0,076%. Данные мониторинговых исследований свидетельствуют о хорошем ответе больного на терапию гливеком, позволяя сделать вывод о том, что описываемая нами комплексная транслокация с вовлечением хромосом 3, 9 и 22 не является неблагоприятной в плане ответа на терапию ингибитором тирозинкиназы.

Заключение

Стандартное цитогенетическое исследование, являющееся обязательным в клинической практике при постановке диагноза ХМЛ, позволяет анализировать весь хромосомный набор клетки и идентифицировать реаранжировки, не выявляемые молекулярно-генетическими методами, в том числе – патогенетическую транслокацию с вовлечением дополнительных хромосом. Картированием костного мозга пациента с ХМЛ нами обнаружена вариантная транслокация t(3;9;22)(p24;q34;q11), до настоящего времени не описанная в литературе. Несмотря на отсутствие классической филадельфийской хромосомы, вовлечение локусов 9q34 и 22q11, а также молекулярно-генетическое подтверждение наличия слитного гена *BCR-ABL* позволяют отнести данную транслокацию к реаранжировкам, ассоциированным с хроническим миелоидным лейкозом. Хороший ответ больного на терапию гливеком говорит об отсутствии неблагоприятного воздействия дополнительного генетического локуса (3p24), вовлеченного в комплексную перестройку, на патогенез заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зельцер А.Н., Бурнашева Е.В., Шатохин Ю.В. Молекулярно-генетическая характеристика хронического миелоидного лейкоза // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2016. – № 1. – С. 4-14.
2. Al-Achkar W., Wafa A., Ikhtiar A., Liehr T. Three-way Philadelphia translocation t(9;10;22)(q34;p11.2;q11.2) as a secondary abnormality in an imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia patient // *Oncol. Lett.* – 2013. – № 5. – P. 1656–1658.
3. Asif M., Hussain A., Rasool M. A rare case of a three way complex variant positive Philadelphia translocation involving chromosome (9; 11; 22 (q34; p15; q11) in chronic myeloid leukemia: A case report // *Oncology letters.* – 2016. – Vol. 12. – № 3. – P. 1986-1988.
4. Luatti S., Baldazzi C., Marzocchi G., et. al. Cryptic *BCR-ABL* fusion gene as variant rearrangement in chronic myeloid leukemia: molecular cytogenetic characterization and influence on TKIs therapy // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – № 18. – P. 29906-29913.
5. Malvestiti F., Agrati C., Chinetti S. et. al. Complex variant of Philadelphia translocation involving chromosomes 9,

- 12, and 22 in a case with chronic myeloid leukaemia // Case reports in genetics. – 2014. – Vol. 2014. – P. 2-3.
6. Mendiola C., Ortega V., Tonk V. et. al. Complex/variant translocations in chronic myelogenous leukemia (CML): genesis and prognosis with 4 new cases // Experimental and molecular pathology. – 2014. – Vol. 97. – № 1. – P. 105-110.
 7. Mendizabal A.M., Younes N., Levine P.H. Geographic and income variations in age at diagnosis and incidence of chronic myeloid leukemia // International journal of hematology. –2016. – T. 103. – № 1. – P. 70-78.
 8. Qin Y.Z., Huang X.J. Molecular Detection of BCR-ABL in Chronic Myeloid Leukemia // Chronic Myeloid Leukemia. – Humana Press, New York, NY, 2016. – P. 1-15.
 9. Shaffer L., McGowan-Jordan J., Schmid M. ISCN 2013. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Basel: Karger; 2013.

Поступила в редакцию 11.04.2018 г.

H.Y. Karimov, K.T. Boboev, B.R. Allanazarova, Yu.Yu. Assesorova

The case variant translocation t(3;9;22) (p24;q34;q11) in chronic myeloid leukemia

Scientific research institute of hematology and blood transfusion of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Tashkent

This paper presents a case of chronic myeloid leukemia with an earlier unknown variant translocation t (3; 9; 22) (p24; q34; q11) detected by cytogenetic research using the GTG-banding technique. Despite the absence of the classical Philadelphia chromosome, the presence of chromosome 9 and 22 derivatives, as well as the *BCR-ABL* fusion gene, allow this translocation to be considered pathogenetic for CML. A good response of the patient to the treatment with glivec is that there is no adverse effect on the pathogenesis of the disease of an additional genetic locus (3p24) involved in complex restructuring.

Keywords: chronic myelogenous leukemia; Ph-chromosome; variant translocation