

Znaczenie techniki aCGH w nowotworach mieloproliferacyjnych – przegląd literatury

The significance of aCGH technique in myeloproliferative neoplasms – a review

Article history:
Received: 19.07.2019
Accepted: 31.07.2019

Katarzyna Osmańska*,
Maria Pilarska-Deltow, Olga Haus

Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska

Streszczenie

Nowotwory mieloproliferacyjne (MPN) są klonalnymi chorobami komórek macierzystych szpiku, które charakteryzują się proliferacją jednej lub więcej linii mieloidalnych krwiotworzenia: granulocytowej, czerwono krwinkowej i/lub megakariocytowej. Do MPN *BCR-ABL1(-)* zalicza się m.in. czerwienicę prawdziwą (PV), nadpłytkowość samoistną (ET) oraz pierwotną mielofibrozę (PMF). Nowotwory mieloproliferacyjne *BCR-ABL1(-)* należą do najmniej poznanych nowotworów układu krwiotwórczego pod względem nabytych zmian genetycznych. Badania nad MPN trwają od ponad 60 lat. Podobieństwo objawów klinicznych wskazuje na wspólną patogenezę PV, ET i PMF. Głównym celem prowadzonych badań jest wytypowanie markerów, które nie tylko pomogą w diagnostyce poszczególnych typów MPN czy w klasyfikacji chorych do grup ryzyka, ale mogłyby być także celem terapeutycznym. Głównym celem terapii jest przedłużenie życia pacjentów, w tym także zminimalizowanie prawdopodobieństwa transformacji w ostrą białaczkę. aCGH jest niewątpliwie techniką bardzo przydatną klinicznie, która, choć nie znalazła jeszcze rutynowego zastosowania w klinice hematologii, to wykorzystywana jest w coraz większej liczbie badań, zwłaszcza do analizy nowotworów, w których istotne są aberracje niezrównoważone. Niniejsza praca przedstawia zastosowanie techniki aCGH w nowotworach mieloproliferacyjnych.

Abstract

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a heterogeneous group of clonal bone marrow stem cell diseases, with overproliferation of one or more types of blood cells (granulocytes, erythrocytes and megakaryocytes). MPNs *BCR-ABL1(-)* include: polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), primary myelofibrosis (PMF), and other diseases. MPNs *BCR-ABL1(-)* are the least known hematopoietic neoplasms in respect of acquired genetic changes. Research on myeloproliferative neoplasms has been going on for over 60 years. The similarity of clinical symptoms indicates a common pathogenesis of PV, ET and PMF. The main aim of the research is to select markers that will not only help the diagnostics of individual types of MPN, or in the classification of patients into risk groups, but could also be a therapeutic goal. The main aim of the therapy is to prolong the life of patients and to minimize the likelihood of transformation into acute leukemia. aCGH is undoubtedly a clinically very useful method which, although not yet routinely used in hematology clinic, was applied in many studies of hematopoietic malignancies, especially those with unbalanced chromosome aberrations. This paper presents the application of the aCGH technique to cytogenetic analysis in myeloproliferative neoplasms.

© 2019 Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine, Insitute of Hematology and Transfusion Medicine. Published by Sciendo. All rights reserved.

Słowa kluczowe:

porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (aCGH), nowotwory mieloproliferacyjne (MPN), fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Keywords:

array Comparative Genomic Hybridization (aCGH), myeloproliferative neoplasms (MPN), fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

Wstęp

Pierwsze opisy współcześnie znanych nowotworów mieloproliferacyjnych pochodzą z XIX i początku XX wieku. W roku 1951 William Dameshek zaproponował pierwszą klasyfikację nowotworów mieloproliferacyjnych. W roku 1960 Peter Nowell i David Hungerford opisali charakterystyczną dla przewlekłej białaczki szpikowej (*chronic myeloid leukemia* – CML) aberrację chromosomową – chromosom Filadelfia (Philadelphia – chromosom Ph), który jest pochodną chromosomu 22, krótszą od prawidłowego chromosomu 22. W 1973 roku Janet Rowley odkryła, że chromosom Filadelfia powstaje w wyniku

translokacji wzajemnej pomiędzy chromosomami 9 i 22. W latach 80. XX wieku dokładnie opisano punkty złamań tych chromosomów, scharakteryzowano geny fuzyjne powstałe w wyniku aberracji oraz stwierdzono, że gen fuzyjny kodujący kinazę *BCR-ABL1* jest nie tylko markerem choroby, ale także czynnikiem wywołującym CML. W 1996 roku po raz pierwszy w terapii CML zastosowano imatynib – pierwszy inhibitor kinazy tyrozynowej. W 2005 roku 4 niezależne zespoły badawcze odkryły, że większość pacjentów z Ph-ujemnymi zespołami mieloproliferacyjnymi posiada mutację w genie *JAK2*. W 2006 roku u części pacjentów z ET i PMF, u których wykluczono mutację w genie *JAK2*, stwierdzono mutację w genie *MPL* [1-5]. W 2013 roku opisano

* Corresponding author: Katarzyna Osmańska, Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel. 52 585 36 81, e-mail: kosmanska@wp.pl

mutacje w genie *CALR*. Zmiany w tym genie występowały u części pacjentów z ET i PMF, u których nie stwierdzono mutacji w genach *JAK2* i *MPL* [6, 7]. W 2012 roku zarejestrowany został lek ruxsolytynib (inhibitor kinazy *JAK2*), który stanowi terapię celowaną dla chorych na MPN. Terapia dostępna jest także w Polsce [8].

W 2008 roku Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization* – WHO) wprowadziła nowy podział nowotworów mieloproliferacyjnych, w odniesieniu do wcześniej obowiązującej klasyfikacji z 2001 roku. Dotychczas obowiązujący termin „przewlekłe choroby mieloproliferacyjne” (*chronic myeloproliferative diseases* – CMPD) zamieniono na „nowotwory mieloproliferacyjne”. Nowa nazwa lepiej opisuje charakter oraz przebieg kliniczny tej grupy chorób. Klasyfikacja ta została uzupełniona w 2016 roku i stanowi algorytm postępowania dla lekarzy klinicyistów, patologów i diagnostów laboratoryjnych [9].

Nowotwory mieloproliferacyjne

Nowotwory mieloproliferacyjne są klonalnymi chorobami komórek macierzystych szpiku, które charakteryzują się proliferacją jednej lub więcej linii mieloidalnej krwiotworzenia: granulocytowej, czerwono-krwinkowej lub megakariocytowej [10, 11].

Aktualna klasyfikacja nowotworów mieloproliferacyjnych według WHO wyróżnia: przewlekłą białaczkę szpikową, przewlekłą białaczkę neutrofilową, czerwienicę prawdziwą, nadpłytkowość samoistną, pierwotną mielofibrozę, przewlekłą białaczkę eozynofilową niesklasyfikowaną inaczej (*chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified* – CEL NOS) i niesklasyfikowany nowotwór mieloproliferacyjny (*myeloproliferative neoplasm, unclassifiable* – MPN-U). Diagnostyka MPN opiera się na obrazie klinicznym, wynikach badań laboratoryjnych, cechach histopatologicznych oraz (w większości przypadków) na obecności nieprawidłowości genetycznych [12]. Obecność chromosomu Ph różnicuje MPN na grupę nowotworów Ph-dodatnich [*BCR-ABL1(+)*], do której zaliczamy przewlekłą białaczkę szpikową, oraz grupę nowotworów Ph-ujemnych [*BCR-ABL1(-)*], do której zaliczamy pozostałe MPN. Choć głównymi czynnikami diagnostyczno-prognostycznymi w MPN są mutacje wiodące (*driver mutations*) genów *JAK2*, *MPL* i *CALR*, aberracje chromosomowe są nadal brane pod uwagę jako elementy diagnozowania i różnicowania tych chorób oraz poszukiwania nowych celów terapeutycznych.

Aberracje chromosomowe w nowotworach mieloproliferacyjnych Ph-ujemnych

Aberracje chromosomowe występują z różną częstością w poszczególnych nowotworach mieloproliferacyjnych. W chwili rozpoznania zmiany cytogenetyczne występują u około 11-20% chorych z PV, 5-10% chorych z ET i około 30-60% chorych z PMF [4, 12, 13]. W miarę trwania choroby pojawiają się nowe aberracje, w wyniku czego zwiększa się odsetek chorych z zaburzeniami kariotypu, osiągając nawet 80-90% wśród chorujących ponad 10 lat. Aberracje chromosomowe występują częściej u chorych po 60. roku życia i prawie u 100% tych, u których nastąpiła transformacja w zespół mielodysplastyczny (*myelodysplastic syndrome* – MDS)

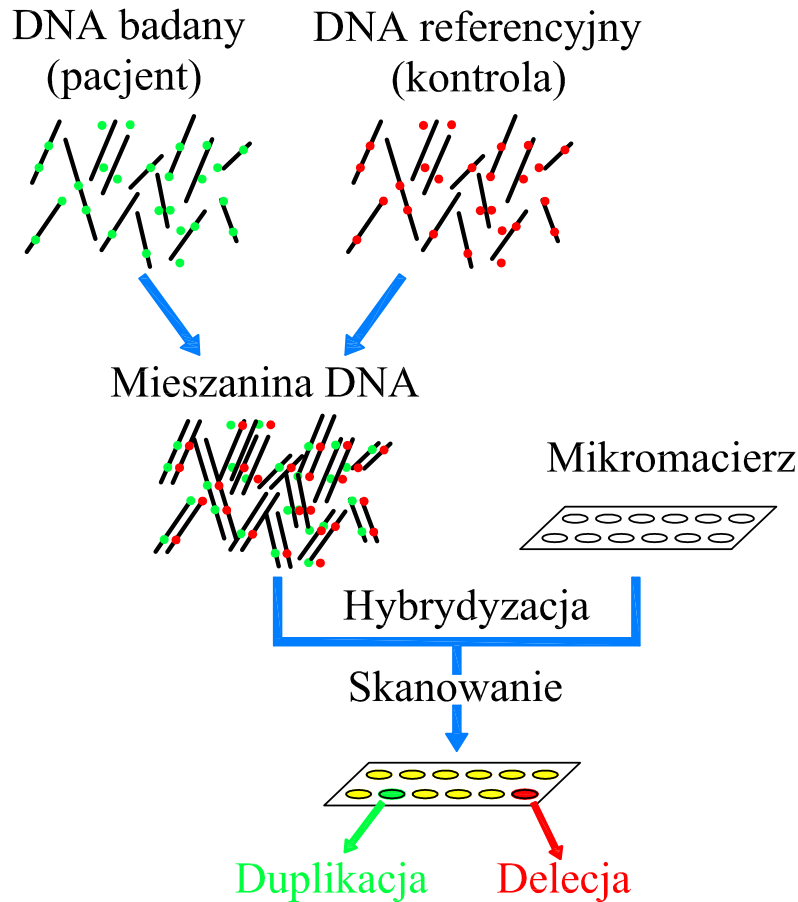
lub ostrą białaczkę szpikową (*acute myeloid leukemia* – AML) [4, 12, 13]. Najczęściej obserwuje się trisomie chromosomów 8 i 9 oraz delecje w obrębie długich ramion chromosomów 13 i 20. Do rzadszych zmian zalicza się: utratę chromosomu Y, dodatkową kopię długiego ramienia chromosomu 1, delecje w obrębie krótkich ramion chromosomów 3 i 12, monosomię chromosomu 6, duplikacje w chromosomie 13, aberracje różnego typu w obrębie chromosomów 9 i 11. Delecje w obrębie długich ramion chromosomów 5 i 7 mogą być wynikiem zastosowanego leczenia cytotoksycznego lub wymagają dokładniejszych analiz morfologicznych w kierunku różnicowania z MDS [4, 12, 14, 15]. W grupie chorych z PV większość aberracji obserwuje się głównie u chorych w wieku > 60 lat. W grupie chorych z ET wiek nie ma związku z występowaniem aberracji chromosomowych. W tej grupie chorych obecność aberracji chromosomowych korespondowała z takimi czynnikami środowiskowymi jak nikotynizm oraz klinicznymi jak wyczuwalna splenomegalia, trombofilia i anemia (hemoglobina poniżej 10 G/l). W grupie chorych z PMF obecność aberracji chromosomowych, zwłaszcza w układzie kariotypu złożonego, uznano za niekorzystny czynnik predykcyjny [4, 16].

Badania cytogenetyczne i cytogenetyczno-molekularne w hematologii

Zgodnie z klasyfikacją WHO nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego analiza cytogenetyczna jest jednym z podstawowych badań diagnostycznych. Obecność charakterystycznych nieprawidłowości chromosomowych umożliwia rozpoznanie poszczególnych jednostek chorobowych. Zastosowanie odpowiedniego leczenia, pozwalającego uzyskać najlepszy efekt terapeutyczny i zmniejszyć ryzyko powikłań, możliwe jest dzięki stwierdzeniu obecności specyficznej mutacji, rearanżacji lub aberracji chromosomowej. Metody cytogenetyki klasycznej oraz cytogenetyki molekularnej wzajemnie się uzupełniają, dlatego ważne jest, aby diagnostyka i monitorowanie pacjentów z nowotworami układu krwiotwórczego opierały się na wynikach badań z zastosowaniem obydwu technik. Według przyjętych wytycznych, badania cytogenetyczne w hematologii należy wykonywać w celu diagnostyki i klasyfikacji nowotworów układu krwiotwórczego, ustalenia rokowania, wyboru odpowiedniej metody leczenia oraz monitorowania przebiegu choroby i efektywności terapii [17].

Cytogenetyka klasyczna po raz pierwszy została wprowadzona do diagnostyki hematologicznej w roku 1960, kiedy Nowell i Hungerford opisali chromosom Filadelfia. Wprowadzone w latach 70. techniki prążkowania chromosomów umożliwiły precyzyjną analizę i identyfikację 23 par chromosomów. Ustalono, że, aby wynik badania był obiektywny, analiza powinna z reguły obejmować co najmniej 20 pletek metafazalnych [17].

Pod koniec lat 80. XX wieku opracowana została technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescent in situ hybridization* – FISH). FISH jest techniką szybką, o wysokiej czułości, doskonale uzupełniającą metody cytogenetyki klasycznej. Może być także wykorzystywana jako samodzielna metoda analizy. Technika FISH skraca oczekiwanie na wynik. Jest techniką ukierunkowaną, stosowaną do identyfikacji naddatków (addycji) chromosomowych nieznanego pochodzenia, chromosomów markerowych, złożonych translokacji oraz mikrodelecji [18].



Ryc. 1. Schemat analizy aCGH

Fig. 1. aCGH analysis scheme

DNA badany wyznakowany jest zielonym fluorochromem, DNA referencyjny – czerwonym. Zmieszany DNA nakładany jest na macierz, w obrębie której następuje hybrydyzacja do konkretnych sond oligonukleotydowych. Kolejnym etapem jest skanowanie macierzy. Przy takiej samej ilości DNA badanego i referencyjnego sygnały się znoszą (kolor żółty). Kolor zielony w danym locus świadczy o jego duplikacji, kolor czerwony – o delecji

Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy, aCGH

Na początku XXI wieku w diagnostyce genetycznej wprowadzono mikromacierze, które stosuje się do identyfikacji nieznaczności genomu u pacjentów z niepełnosprawnością intelektualną, autyzmem, dysmorfiami i wadami wrodzonymi, a także w diagnostyce onkologicznej. W genetyce klinicznej i onkologicznej zastosowanie znalazły głównie: porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (*microarray-based comparative genomic hybridisation* – aCGH = *array CGH*) oraz mikromacierze SNP (*array-based single nucleotide polymorphism* – *array SNP*). Technika aCGH jest rutynowo wykorzystywana w genetyce klinicznej do identyfikacji delecji i duplikacji. Obecnie stosowane platformy umożliwiają identyfikację delecji nawet pojedynczych eksonów. Najczęściej stosowanymi platformami są platformy oligonukleotydowe, w których kilkaset tysięcy oligonukleotydów (odpowiadających prawie całemu genomowi) jest unieruchomionych na szkiełku podstawowym [17, 19]. Technika aCGH, która nazywana jest kariotypowaniem molekularnym, pozwala określić rodzaj nieznaczności aberracji, jej wielkość oraz lokalizację w genomie [20-22]. Dzięki tej technice

możliwe jest wykrycie aberracji, które nie są widoczne w klasycznej analizie kariotypu ani w technice FISH [23, 24]. W zależności od konstrukcji macierzy, aCGH może uzyskać rozdzielczość sięgającą 10-100 kpz, podczas gdy klasyczna cytogenetyka zapewnia rozdzielczość rzędu około 5 Mpz (mega paz zasad), a FISH około 0,04-0,25 Mpz. Ponadto, możliwa jest jednoczesna analiza wielu *loci* genomowych w jednym badaniu. Ograniczeniem techniki jest brak możliwości wykrywania aberracji zrównoważonych, czyli bez zmian ilościowych materiału genetycznego oraz wykrycie zmian obecnych w niewielkim odsetku komórek [17, 22, 25, 26].

Zasada techniki aCGH

Technika aCGH opiera się na kompetycyjnej hybrydyzacji do sond zawartych w mikromacierzy 2 różnych sekwencji genomowego DNA – DNA badanego (chorego) oraz DNA referencyjnego (prawidłowego, kontrolnego). Każdy z nich wyznakowany jest innym fluorochromem; badany DNA z reguły zielonym, referencyjny – czerwonym. Wyznakowane DNA hybrydują do komplementarnych sekwencji sond oligonukleotydowych umieszczonych na platformie

(mikromacierzy). Ocena ilościowa wzajemnego stosunku intensywności obu sygnałów fluorescencyjnych pozwala na jednoczesną analizę wszystkich *loci* i identyfikację duplikacji/amplifikacji jednych *loci* oraz delecji/utruty innych. Rozdzielczość ograniczona jest liczbą i wielkością sond oligonukleotydowych użytych do konstrukcji macierzy. Odczytu fluorescencji dokonuje się przy zastosowaniu skanera z odpowiednim oprogramowaniem (Ryc. 1). Niewątpliwą zaletą aCGH jest możliwość identyfikacji aberracji submikroskopowych z rozdzielczością nieosiągalną w cytogenetyce klasycznej. W zależności od konstrukcji macierzy, aCGH może uzyskać rozdzielczość sięgającą 10-100 kb. Ponadto, jak wyżej wspomniano, możliwa jest jednoczesna analiza wielu *loci* genomowych w jednym badaniu. Ograniczeniem metody jest brak możliwości wykrywania aberracji zrównoważonych, czyli bez zmian ilościowych materiału genetycznego oraz ograniczona możliwość wykrywania poliploidii, czyli zwielokrotnienia całego garnituru haploidalnego [17, 22, 25, 26].

W interpretacji wyniku uzyskanego z zastosowaniem aCGH uwzględnia się takie parametry, jak: typ aberracji (delecja, duplikacja), jej wielkość oraz liczba i funkcja genów, które znajdują się w obrębie zmienionego regionu [20, 27, 28]. Wynik badania podawany jest zgodnie z wystandaryzowanym zapisem przedstawionym w aktualnym wydaniu An International System for Human Cytogenomic Nomenclature 2016 (ISCN 2016) [29].

Zastosowanie CGH do mikromacierzy w hematoonkologii

Identyfikacja aberracji chromosomowych oraz polimorfizmów liczby kopii regionów chromosomowych (*copy number variants* – CNV) pozwala lepiej zrozumieć patogenezę chorób nowotworowych. Regiony chromosomowe, które ulegają duplikacji, zawierają m.in. onkogeny oraz geny antyapoptotyczne i geny odpowiedzialne za proliferację i oporność, zaś regiony ulegające delecji zawierają m.in. geny supresorowe, geny apoptozy i różnicowania. Prowadzonych jest coraz więcej badań z zastosowaniem mikromacierzy CGH u pacjentów onkologicznych – zarówno w zakresie nowotworów układu krwiotwórczego, jak i guzów litych. aCGH jest niewątpliwie techniką bardzo przydatną klinicznie, jednak nie znalazła jeszcze rutynowego zastosowania w klinice hematoonkologii. Najprawdopodobniej powodem są wysokie koszty oraz skomplikowana analiza bioinformatyczna, niezbędna do interpretacji uzyskanego wyniku. Przy mnogości danych uzyskiwanych w wyniku aCGH w hematoonkologii, trudno czasem wyłuskać te, które są istotne, mimo weryfikacji wyniku aCGH innymi technikami, np. zależna od ligacji multipleksowa amplifikacja sond (*multiplex ligation-dependent probe amplification* –MLPA) lub FISH [17, 19, 30-32]. Ograniczeniem tej techniki w chorobach nowotworowych bywa brak do analizy materiału o odpowiedniej jakości (np. mała ilość szpiku o niskiej komórkowości, uzyskana z biopsji) [33-38].

Schwaenen i wsp. jako pierwsi wykonali badanie aCGH w hematoonkologii [39]. Kolejne grupy badaczy poszukują za pomocą aCGH nowych rearanżacji chromosomowych, które nie zostały wykryte z wykorzystaniem cytogenetyki klasycznej.

Zastosowanie CGH do mikromacierzy w badaniach nowotworów mieloproliferacyjnych

Brecqueville i wsp. przeprowadzili analizę aCGH u 35 chorych z PMF i 73 z MPN innym niż PMF. Celem badania było wykrycie delecji genu *BMI1* [*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (mouse)*], dlatego wyniki całych analiz aCGH nie były opisane szczegółowo. Gen *BMI1* jest odpowiedzialny za samoodnawianie komórek macierzystych i progenitorowych. Badania na modelu mysim wykazały, że u osobników z delecją genu *Bmi1* rozwijała się choroba z objawami klinicznymi charakterystycznymi dla PMF. W swoim badaniu Brecqueville i wsp. opisali tylko jednego chorego, u którego obok delecji *locus BMI1*, stwierdzono kilka innych małych delecji [40]. W innej pracy Brecqueville i wsp. przeprowadzili analizę aCGH u 63 chorych z PMF. U 34 chorych (54% grupy badanej) stwierdzili obecność aberracji chromosomowych; u 17 stwierdzono obecność jednej aberracji, u 6 – dwóch, u 11 – trzech lub więcej. Zaobserwowano zarówno aberracje obejmujące regiony chromosomowe > 4 Mpz, jak i delecje obejmujące pojedyncze geny. Najczęściej obserwowaną aberracją była delecja długiego ramienia chromosomu 20 (20q-) [41].

Courtier i wsp. przeprowadzili analizę aCGH u 56 chorych z MPN i 38 z AML po MPN. U 40 chorych (43%) stwierdzili aberracje; delecje pojedynczych genów lub utraty bądź dodatkowe kopie całych chromosomów [42]. Tefferi i wsp. przeprowadzili analizę aCGH u 71 chorych z MPN. Rearanżacje stwierdzili u 25 z nich (35% grupy badanej): 14/32 chorych z PMF (44%), 9/26 z PV (35%) i 2/13 z ET (15%) [43]. Mehrotra i wsp. analizowali 17 chorych z PMF z izolowaną delecją 13q. W badaniu GTG najczęstszym regionem delecyjnym chromosomu 13 był 13q13-q14.3. Analiza przeprowadzona przez Mehrotra i wsp. wykazała obecność w tym regionie delecji o wielkości od 14,7 Mpz do 36,8 Mpz. Najmniejszy wspólny region delecyjny (*commonly deletion region* – CDR) zawierał się między 13q13.3 a 13q14.4 i miał wielkość 15,323 Mpz. W CDR znajdował się między innymi gen *RB1* [44]. Delecję 13q u 8 chorych z MPN (3 z PMF, 4 z PV i 1 z ET) stwierdzili także Olcaydu i wsp. Najmniejszy wspólny region delecyjny w ich pracy wynosił 9,8 Mpz i również obejmował gen *RB1* [45]. Pomimo wielu badań nie znaleziono jeszcze związku pomiędzy tą aberracją a objawami klinicznymi.

Delecja 20q jest aberracją bardzo często opisywaną, zarówno u pacjentów z MPN, jak i z innymi nowotworami układu krwiotwórczego [46-50]. Uważa się, że jest ona pierwotną aberracją w kariotypach złożonych, co wskazywałoby na kluczową rolę tej zmiany w leukemogenezie. Poznanie na poziomie molekularnym związku pomiędzy delecją 20q a rozwojem MPN mogłoby być ważne w odniesieniu do poszukiwania nowych, celowanych terapii [51]. W literaturze można znaleźć także opisy delecji 20q u osób, u których nie stwierdzono żadnych objawów nowotworu szpiku [52]. Okada i wsp. przy pomocy aCGH analizowali delecję 20q stwierdzoną w kariotypie u 12 chorych na nowotwory układu krwiotwórczego, w tym MPN. U wszystkich delecja miała charakter interstycjalny, a punkty złamań chromosomu 20 u różnych chorych zawierały się w regionie 20q11.21~12 do 20q13.13~13.33. Wielkość delecji wahała się od 11,2 Mpz do 27,3 Mpz. Najmniejszy wspólny region delecyjny dla wszystkich pacjentów wynosił 7,2 Mpz. Delecje zostały potwierdzone

przy pomocy techniki FISH [53]. MacKinnon i wsp. donieśli o jeszcze mniejszym wspólnym regionie delecyjnym 20q u chorych z AML, MDS i MPN, wynoszącym 1,7 Mbp [54].

Tefferi i wsp. porównali wyniki GTG i aCGH u 57 chorych z rozpoznaniem MPN: 25 z PMF, 21 z PV i 11 z ET. Nieprawidłowy wynik GTG uzyskali tylko u 9 chorych (16% grupy badanej), podczas gdy analiza aCGH wykazała obecność aberracji u 20 chorych (35% grupy badanej). W grupie chorych z nieprawidłowym wynikiem aCGH znalazło się 4 z nieprawidłowym wynikiem GTG i 16 z prawidłowym wynikiem GTG. W grupie 21 chorych z PV techniką aCGH aberracje stwierdzono u 29%, w grupie 11 pacjentów z ET – u 18%. Wynik badania GTG był u nich wszystkich prawidłowy. W grupie chorych z PMF nieprawidłowy wynik aCGH stwierdzono u 48%, natomiast aberracje w badaniu GTG zidentyfikowano u 36% [43]. Potrzebne są dalsze badania, aby stwierdzić, czy wszystkie zmiany obserwowane w badaniu aCGH mają takie same znaczenie prognostyczne jak te, które obserwuje się w badaniach wykonanych techniką GTG [37].

Slovak i wsp. w grupie 30 chorych z AML, MDS i PMF wykonali badania technikami GTG, aCGH i FISH. W badaniu GTG u chorego z PMF stwierdzono obecność chromosomu pochodnego der(1;7). Natomiast analiza aCGH wykazała u niego jeszcze obecność 4 delecji: 5q32, 12p13.1, 13q14.2q14.3 oraz 17q11.2. Obecność wszystkich wyżej wymienionych aberracji została potwierdzona techniką FISH [55]. Shao i wsp. wykonali badania GTG, FISH i aCGH łącznie u 55 chorych z różnymi nowotworami hematologicznymi, stwierdzając znaczną rozbieżność wyników badań wykonanych różnymi technikami. Rozbieżności te wynikały z ograniczeń jednych technik w stosunku do innych (brak możliwości oceny małych klonów komórkowych oraz aberracji zrównoważonych w aCGH, brak dostępnych sond FISH dla niektórych regionów, zbyt mała rozdzielczość GTG), ale też – w pojedynczych przypadkach – z braku wykonania badania GTG oraz zastosowania w badaniu FISH jedynie ściśle wyselekcjonowanego, jednolitego dla danej jednostki chorobowej panelu sond [39].

Podsumowanie

Techniki GTG, FISH i aCGH mają różną rozdzielczość. Każda z nich ma swoje zalety i ograniczenia. Wzajemnie się uzupełniają, przez co dają lepszy wgląd w zmiany genetyczne obecne u chorych [56-60]. Analiza techniką GTG uważana jest za złoty standard diagnostyki w hematologii. Dzięki tej technice możliwe jest też uzyskanie informacji na temat klonalności wykrytej zmiany. Niestety, do wykonania badania tą techniką potrzebne są aktywnie dzielące się komórki. Jakość uzyskanych płytek metafazalnych w wielu przypadkach może być niewystarczająca do identyfikacji niektórych rearanżacji, zwłaszcza w kariotypach złożonych. Technika FISH jest pewnego rodzaju pomostem pomiędzy standardami cytogenetycznymi a diagnostyką molekularną. Jest techniką o większej rozdzielczości niż GTG, jednak w jednym badaniu możliwa jest analiza ograniczonej liczby *loci*. Technika aCGH jest relatywnie nową techniką stosowaną w onkologii. Umożliwia ona identyfikację klinicznie istotnych CNVs, które nie są możliwe do zaobserwowania w technikach GTG czy FISH [61].

Wskazuje się na kilka aspektów świadczących o przewadze aCGH nad FISH. Technika aCGH umożliwia analizę w jednej reakcji całego genomu pod kątem delecji, duplikacji i amplifikacji, podczas gdy analiza FISH ograniczona jest liczbą sond, które można jednocześnie zastosować. Badanie FISH wymaga wstępnej diagnozy u chorego, aby możliwe było odpowiednie dobranie sond. Dodatkowo, w analizie techniką FISH łatwo jest wykryć mikrodelecję, natomiast identyfikacja duplikacji (nawet na płycie metafazalnej) przysparza już nieco problemów. Takie ograniczenia nie pojawiają się w przypadku analizy z zastosowaniem techniki aCGH. Jednakże technika FISH ma także przewagę nad aCGH: pozwala wykryć poliploidie oraz aberracje zrównoważone, a także dokładnie umiejscowić daną zmianę (analiza na płycie metafazalnej) [62, 63].

W wielu krajach w diagnostyce niepełnosprawności intelektualnej, dysmorfii czy wad wrodzonych aCGH jest badaniem z wyboru wypierającym technikę GTG [62]. Platformy aCGH coraz częściej stosowane są w diagnostyce onkologicznej, również w hematologii. Jednakże, chociaż technika ta umożliwia wykrycie nowych zmian związanych z nowotworzeniem, nadal wykorzystuje się ją raczej do badań naukowych. Rutynowa diagnostyka hematologiczna z zastosowaniem techniki aCGH jest w chwili obecnej ograniczona, głównie z uwagi na koszty, potrzebę dużego zaplecza technicznego oraz z powodów częstych trudności z interpretacją wyników badań [37].

Czerwieńca prawdziwa, nadpłytkowość samoistna i pierwotna mielofibroza mają wspólne cechy kliniczne, dlatego potrzebne są badania cytogenetyczne i cytogenetyczno-molekularne w celu lepszego poznania ich patogenezy i podłoża genetycznego. Biorąc pod uwagę dane z piśmiennictwa, można wysunąć tezę, że badanie techniką aCGH byłoby dobrym uzupełnieniem diagnostyki i ustalania rokowania u chorych z podejrzeniem nowotworu mieloproliferacyjnego.

Wkład autorów/Authors' contributions

KO – koncepcja pracy, opracowanie tekstu artykułu, zebranie piśmiennictwa

MPD – wprowadzenie poprawek do całości tekstu, weryfikacja całości tekstu

OH – koncepcja pracy, wprowadzenie poprawek do całości tekstu, weryfikacja całości tekstu.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo References

- [1] Michiels JJ, De Raeve H, Valster F, Potters V, Kim Y, Kim M. Extension of 2016 World Health Organization (WHO) Classification into a new set of clinical, laboratory, molecular, and pathological criteria for the diagnosis of myeloproliferative neoplasms: from Dameshek to Vainchenker, Green, and Kralovics. *EMJ* 2017;2:72–81.
- [2] Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: a decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol* 2016;91:50–8.
- [3] Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* 2008;22:3–13.
- [4] Vakil E, Tefferi A. BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms: a review of molecular biology, diagnosis, and treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;Suppl 1:S37–S45.
- [5] Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. *MPLW515L* is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3:1140–51.
- [6] Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369:2379–90.
- [7] Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med* 2013;369: 2391–405.
- [8] Manduzio P. Ruxolitinib in myelofibrosis: to be or not to be an immune disruptor. *Ther Clin Risk Manag* 2017;13:169–77.
- [9] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391–405.
- [10] Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;118:1723–35.
- [11] Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017;129:667–79.
- [12] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (red.). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th Edition. Lyon: IARC Press, 2017.
- [13] Sever M, Quintás-Cardama A, Pierce S, Zhou L, Kantarjian H, Verstovsek S. Significance of cytogenetic abnormalities in patients with polycythemia vera. *Leuk Lymphoma* 2013;54:2667–70.
- [14] Jeong JH, Ahn JY, Park PW, et al. A t(11;14)(p13;q11.2) in myelofibrosis following polycythemia vera. *Cancer Genet-NY* 2016;209:112–6.
- [15] Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: Clinical implications. *Cancer Letters* 2007;255:12–25.
- [16] Hussein K, Pardanani AD, Van Dyke DL, Hanson CA, Tefferi A. International Prognostic Scoring System: independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. *Blood* 2010;115:496–9.
- [17] Macheta A, Chocholska S, Podhorecka M. Metody genetyczne w diagnostyce hematologicznej. *Postepy Hig Med Dosw* 2015;69:475–87.
- [18] Ratan Z, Zaman S, Mehta V, Haidere MF, Runa NJ, Akter N. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique for the detection of genetic aberration in medical science. *Cureus* 2017;9:e1325.
- [19] Zmorzyński S, Filip AA, Koczkodaj D, Michalak M. Molekularne i cytogenetyczne czynniki prognostyczne w ostrej białaczce szpikowej (OBS). *Postepy Hig Med Dosw* 2011;65:158–66.
- [20] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010;86:749–64.
- [21] Morrow EM. Genomic copy number variation in disorders of cognitive development. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2010;49:1091–104.
- [22] Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today* 2008;13:760–70.
- [23] Koczkodaj D, Filip A, Tomczak W, Wąsik-Szczepanek E. Comparative genomic hybridization arrays in complex karyotype analysis – an AML case report. *Centr Eur J Immunol* 2011;36:40–5.
- [24] Theisen A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education* 2008;1:45.
- [25] Szczałuba K, Obersztyń E, Mazurczak T. Zastosowanie nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej w diagnostyce wrodzonych wad rozwojowych. *Perinatol Neonatol Ginekol* 2010;3:108–16.
- [26] Lukackova R, Gerykova Bujalkova M, Majerova L, Mladosevicova B. Molecular genetic methods in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2014;158:339–45.
- [27] Kearney MH, Thorland EC, Brown KK. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* 2011;13:680–5.
- [28] Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ. Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat* 2012;33:906–15.
- [29] McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (red). ISCN (2016). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2016). Basel, Switzerland: S. Karger AG; 2016.
- [30] Jarosová M, Pospíšilová H, Plachý R, et al. Principle and importance of using the array CGH in hematocology. *Cas Lek Cesk* 2006;145:9–13.
- [31] Suela J, Alvarez S, Cigudosa JC. DNA profiling by arrayCGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cytogenet Genome Res* 2007;118:304–9.
- [32] Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update* 2004;10:221–6.
- [33] O'Sullivan JM, Harrison CN. JAK-STAT signaling in the therapeutic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Mol Cell Endocrinol* 2017;15:71–79.
- [34] Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann NY Acad Sci* 2009;1151:157–66.
- [35] Kallioniemi A. CGH microarrays and cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:36–40.
- [36] Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med* 2010;12:742–5.

- [37] Simons A, Sikkema-Raddatz B, de Leeuw N, Konrad NC, Hastings RJ, Schoumans J. Genome-wide arrays in routine diagnostics of hematological malignancies. *Hum Mutat* 2012;33:941–8.
- [38] MacKinnon RN, Selan C, Zordan A, Wall M, Nandurkar H, Campbell LJ. CGH and SNP array using DNA extracted from fixed cytogenetic preparations and long-term refrigerated bone marrow specimens. *Mol Cytogenet* 2012;5:10.
- [39] Shao L, Kang S-HL, Li J, et al. Array comparative genomic hybridization detects chromosomal abnormalities in hematological cancers that are not detected by conventional cytogenetics. *J Mol Diagn* 2010;12:670–9.
- [40] Brecqueville M, Adélaïde J, Bertucci F, et al. Alterations of polycomb gene *BMI1* in human myeloproliferative neoplasms. *Cell Cycle* 2012;15:3141–2.
- [41] Brecqueville M, Rey J, Devillier R, et al. Array comparative genomic hybridization and sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica* 2014;99:37–45.
- [42] Courtier F, Carbuca N, Garnier S, et al. Genomic analysis of myeloproliferative neoplasms in chronic and acute phases. *Haematologica* 2017;102:e11–e14.
- [43] Tefferi A, Sirhan S, Sun Y, et al. Oligonucleotide array CGH studies in myeloproliferative neoplasms: comparison with *JAK2V617F* mutational status and conventional chromosome analysis. *Leuk Res* 2009;33:662–4.
- [44] Mehrotra M, Patel KP, Chen T, et al. Genomic and clinicopathologic features of primary myelofibrosis with isolated 13q deletion. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15:496–505.
- [45] Olcaydu D, Berg T, Gisslinger B, Gisslinger H, Kralovics R. Deletions of chromosome 13q in myeloproliferative neoplasms: mapping, relation to the *JAK2-V617F* mutation and evaluation of potential tumor suppressor candidates. *Blood* 2008;112:3724.
- [46] Aziz A, Baxter EJ, Edwards C, et al. Cooperativity of imprinted genes inactivated by acquired chromosome 20q deletions. *J Clin Invest* 2013;123:2169–82.
- [47] Busson M, Romana S, Nguyen Khac F, Bernard O, Berger R. Cryptic translocations involving chromosome 20 in polycythemia vera. *Ann Genet* 2004;47:365–71.
- [48] Hasserjian RP, Dal Cin P. Deletion of chromosome 20q: friend or foe? *Leuk Res* 2011;35:844–5.
- [49] MacKinnon RN, Duivenvoorden HM, Campbell LJ. Unbalanced translocations of 20q in AML and MDS often involve interstitial rather than terminal deletions of 20q. *Cancer Genet* 2011;204:153–61.
- [50] Wu C, Zhang J, Bai S, et al. Clinical and molecular cytogenetic studies in ten patients with hematological malignancies characterized by t(20;21)(q11;q11) resulted from del(20q). *Cancer Genet* 2016;209:456–62.
- [51] MacKinnon RN, Selan C, Wall M, Baker E, Nandurkar H, Campbell LJ. The paradox of 20q11.21 amplification in a subset of cases of myeloid malignancy with chromosome 20 deletion. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:998–1013.
- [52] Jawad MD, Shi M, Oliveira JL, Hoyer JD, Hook C, Go RS. Clinical course of patients with incidental finding of 20q- in the bone marrow without a morphologic evidence of myeloid neoplasm. *Am J Hematol* 2016;91:556–9.
- [53] Okada M, Suto Y, Hirai M, et al. Microarray CGH analyses of chromosomal 20q deletions in patients with hematopoietic malignancies. *Cancer Genet-NY* 2012;205:18–24.
- [54] MacKinnon RN, Patsouris C, Chudoba I, Campbell LJ. A FISH comparison of variant derivatives of the recurrent dic(17;20) of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: obligatory retention of genes on 17p and 20q may explain the formation of dicentric chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46:27–36.
- [55] Slovak ML, Smith DD, Bedell V, et al. Assessing karyotype precision by microarray-based comparative genomic hybridization in the myelodysplastic/myeloproliferative syndromes. *Mol Cytogenet* 2010;3:23.
- [56] Passamonti F, Thiele J, Girodon F, et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2012;120:1197–201.
- [57] Sandberg AA, Meloni-Ehrig AM. Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;203:102–126.
- [58] Costa JL, Meijer G, Ylstra B, Caldas C. Array comparative genomic hybridization copy number profiling: a new tool for translational research in solid malignancies. *Semin Radiat Oncol* 2008;18:98–104.
- [59] Gouas L, Goumy C, Véronèse L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. *Pathol Biol (Paris)* 2008;56:345–53.
- [60] Riegel M. Human molecular cytogenetics: from cells to nucleotides. *Genet Mol Biol* 2014;37(1 Suppl):194–209.
- [61] Xu X, Johnson EB, Leverton L, et al. The advantage of using SNP array in clinical testing for hematological malignancies – a comparative study of three genetic testing methods. *Cancer Genet* 2013;206:317–26.
- [62] Ahn JW, Coldwell M, Bint S, Mackie Ogilvie C. Array comparative genomic hybridization (array CGH) for detection of genomic copy number variants. *J Vis Exp* 2015;96:e51718.
- [63] Bejjani BA, Shaffer LG. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *JMD* 2006;8:528–33.