

ВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ ФИБРОСАРКОМА: КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШЕСТИ СЛУЧАЕВ

О.П. Близиуков¹, Н.А. Козлов²

¹ Российский научный центр рентгенодиагностики Минздравсоцразвития, г. Москва

² Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва

Ключевые слова: воспалительная фибросаркома, воспалительная миофибробластическая опухоль, ALK

Воспалительная фибросаркома – злокачественная мезенхимальная опухоль из группы фибробластических сарком. Приведено описание клинико-морфологических свойств шести случаев воспалительной фибросаркомы. По нашим данным, опухоль поражает средостение, малый таз и печень у лиц в возрасте от 12 до 64 лет, обладает инфильтративным ростом. Рецидивы в месте первичного узла опухоли возникли у двух больных, отдаленные метастазы – у четырех больных. Смерть четырех больных наступала в сроки от 7 до 14 мес, после установления диагноза опухоли и была связана с прогрессированием заболевания. Опухоль построена из неопластических фибробластов и миофибробластов с полиморфными ядрами и высокой митотической активностью. В одном из шести случаев обнаружена транслокация гена ALK с высокой экспрессией продукта транслокации в миофибробластах опухоли. Обсуждаются вопросы гистогенеза и нозологической классификации воспалительной фибросаркомы.

Введение

Воспалительная миофибробластическая опухоль – это опухоль с неопределенным (промежуточным) потенциалом злокачественности, построенная из неопластических фибробластов и миофибробластов, среди которых находятся клетки воспалительного инфильтрата. Опухоль имеет разную локализацию – нет ни одного органа или ткани, в которой не было бы показано развития воспалительной миофибробластической опухоли [10]. Чаще опухоль развивается в легком, брыжейке тонкой кишки, мочевом пузыре и средостении. Опухоль возникает преимущественно у детей и подростков. Патогенез развития воспалительной миофибробластической опухоли связан с транслокациями гена рецептора тирозинкиназы анапластической лимфомы (ALK) и высокой экспрессией его химерных продуктов в клетках опухоли.

Клиническое течение воспалительной миофибробластической опухоли имеет разный характер. На одном конце спектра стоит медленный экспансивный рост узла опухоли, длящийся, подобно гранулематозному воспалению, месяцами, на другом – быстрый инфильтративный рост в окружающие ткани с их разрушением и отдаленные метастазы. Предсказать характер роста воспалительной мио-

фибробластической опухоли на основе данных гистологического исследования, экспрессии клеточных белков или онкогенов невозможно – все попытки найти надежные прогностические маркеры завершились неудачами [3].

Начальные этапы развития опухоли сопровождаются потерей массы тела, лихорадкой, анемией и повышением в крови концентрации белков острой фазы воспаления, что в определенном смысле оправдывает прилагательное «воспалительная» в названии опухоли. На следующем этапе развития опухоли появляются синдромы сдавления тех органов и тканей, в которых она возникла.

Длительное время считали, что воспалительная миофибробластическая опухоль является доброкачественной [2, 6]. В этом убеждал анализ клинических исходов хирургического лечения воспалительной миофибробластической опухоли в легком и мочевом пузыре – тех местах, где она встречается чаще всего. Однако в 1990 г. исследователи Института патологии вооруженных сил США (AFIP) J. Meis и F. Enzinger привели описание четырех случаев воспалительной миофибробластической опухоли с инфильтративным ростом и метастазами, которые явились причиной смерти больных [7]. Для этих опухолей был предложен термин *воспалительная фибросаркома*, который, однако, не нашел общего одобрения среди патологов.

Неопределенность в нозологической трактовке воспалительной фибросаркомы сохраняется до сих пор. Эксперты ВОЗ рассматривают воспалительную

Адрес для корреспонденции

Близиуков О.П.

E-mail: blisnukov@mail.ru

фибросаркому как крайнюю и очень узкую часть спектра дифференцировки воспалительной миофибробластической опухоли [3]. Это связано, с одной стороны, с ограниченным числом наблюдений воспалительной фибросаркомы – в англоязычной литературе приведено описание двадцати семи случаев. С другой стороны, воспалительная фибросаркома не имеет специфических гистологических и молекулярно-биологических признаков, которые отличали бы ее от воспалительной миофибробластической опухоли. Другая часть исследователей считают воспалительную фибросаркому самостоятельной нозологической формой, а количество случаев опухоли искусственно заниженным [7, 10]. Это объясняется тем, что случаи воспалительной фибросаркомы трудны для рутинной морфологической диагностики, требуют специальных методов исследования, и обычно их скрывают под маской других нозологических форм. Диагноз воспалительной фибросаркомы основывается в большей мере на особенностях клинического течения опухоли, а не на данных морфологических и молекулярно-биологических исследований.

В отечественной литературе работы, посвященные воспалительной фибросаркоме, отсутствуют. В настоящей работе приведено клиничко-морфологическое описание шести наблюдений воспалительной фибросаркомы.

Материалы и методы

Исследован материал шести воспалительных фибросарком. Материал включал опухоли, удаленные во время операций и полученные при аутопсии умерших больных в Российском научном центре рентгенорадиологии Минздравсоцразвития (4 случая) и в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина РАМН (2 случая) в период с 2004 по 2011 г. Сроки наблюдения за больными составляли от 7 до 14 месяцев. Диагнозы опухолей средостения, малого таза и печени были поставлены на основе данных КТ- и МРТ-исследований. Цитологическое исследование материала биопсий не позволило подтвердить или опровергнуть наличия опухолевых клеток ни в одном случае. Гистологическое исследование материала инцизионных биопсий не проводилось. Морфологическое строение и степень злокачественности опухолей были установлены только по результатам исследования материала аутопсий или материала опухолей, удаленных во время операций.

Материал опухоли фиксировали в 10% растворе формалина; заливали в парафин и готовили серийные срезы толщиной 3–4 мкм. Срезы окрашивали в растворе гематоксилина и эозина и пикрофуксина. При иммуногистохимическом исследовании были использованы следующие моноклональные антитела: к антигену фибробластов (клон 5B5), десмину (клон

D33), актинам мышечных клеток (клон HNF35), α -актину гладких мышц (клон 1A4), калпонию (клон CALP), Н-калдесмону (клон h-CD), миогенину (клон F5D), CD34 (клон QBEnd10), ALK (клон ALK1) («ДАКО», Дания). Рабочие разведения перечисленных антител подобраны эмпирически. Система визуализации EnVision™ Kits HRP (DAB+) («ДАКО», Дания). Использован буферный раствор для высокотемпературного открытия антигенных детерминант в клетках опухоли: 10 mM цитрат/NaOH, pH 6,0.

Транслокацию гена ALK в клетках исследовали в парафиновых срезах опухоли с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Использован меченный флуорофорами нуклеотидный зонд Vysis 2p23 LSI ALK Dual Color («Vysis», США). Зонд содержит последовательность, которая гибридизируется с 3' 250 kb-участком гена ALK (оранжевый сигнал) и 5' 300 kb-участком гена ALK (зеленый сигнал) вблизи точки разрыва t(2;5) на хромосоме 2p23. При отсутствии транслокации гена ALK в ядрах клеток имеется один слитый желтый сигнал, при наличии транслокации два отдельных сигнала – оранжевый и зеленый. Условия подготовки парафиновых срезов, гибридизации зонда, реагенты и интерпретация сигналов приведены ранее в работе [4].

Результаты

Клинические данные

Данные о поле и возрасте больных, локализации опухоли и клиническом течении заболевания приведены в таблице. Больные – мужчины и женщины в возрасте от 12 до 64 лет. Преимущественная локализация узла опухоли – средостение. Рецидивы в месте первичного узла опухоли возникли у двух больных, отдаленные метастазы – у четырех больных. У больных с опухолью малого таза и печени произведено хирургическое удаление узлов опухолей, обе больные живы к моменту исследования. Больные с опухолями средостения признаны неоперабельными, им проводилась лучевая терапия и химиотерапия. Эти больные умерли от соматических осложнений, связанных с ростом опухоли; причинами смерти больных являлись очаговые пневмонии (2 случая), тромбоз верхней полой вены и алиментарная кахексия, связанная с эрозивно-язвенным стоматитом и эзофагитом.

Внешний вид опухолей

Опухоли представлены узлами солидного строения диаметром 7–12 см или построены из нескольких сливающихся узлов меньшего размера. Ткань узлов гомогенного вида, мягко-эластичной консистенции, серо-розового цвета. Опухолевые узлы имеют четкую границу с окружающими тканями. Фиброзная псевдокапсула узлов частично сформирована в опухолях малого таза и печени и не сформирована в опухолях средостения (рис. 1 а–е).

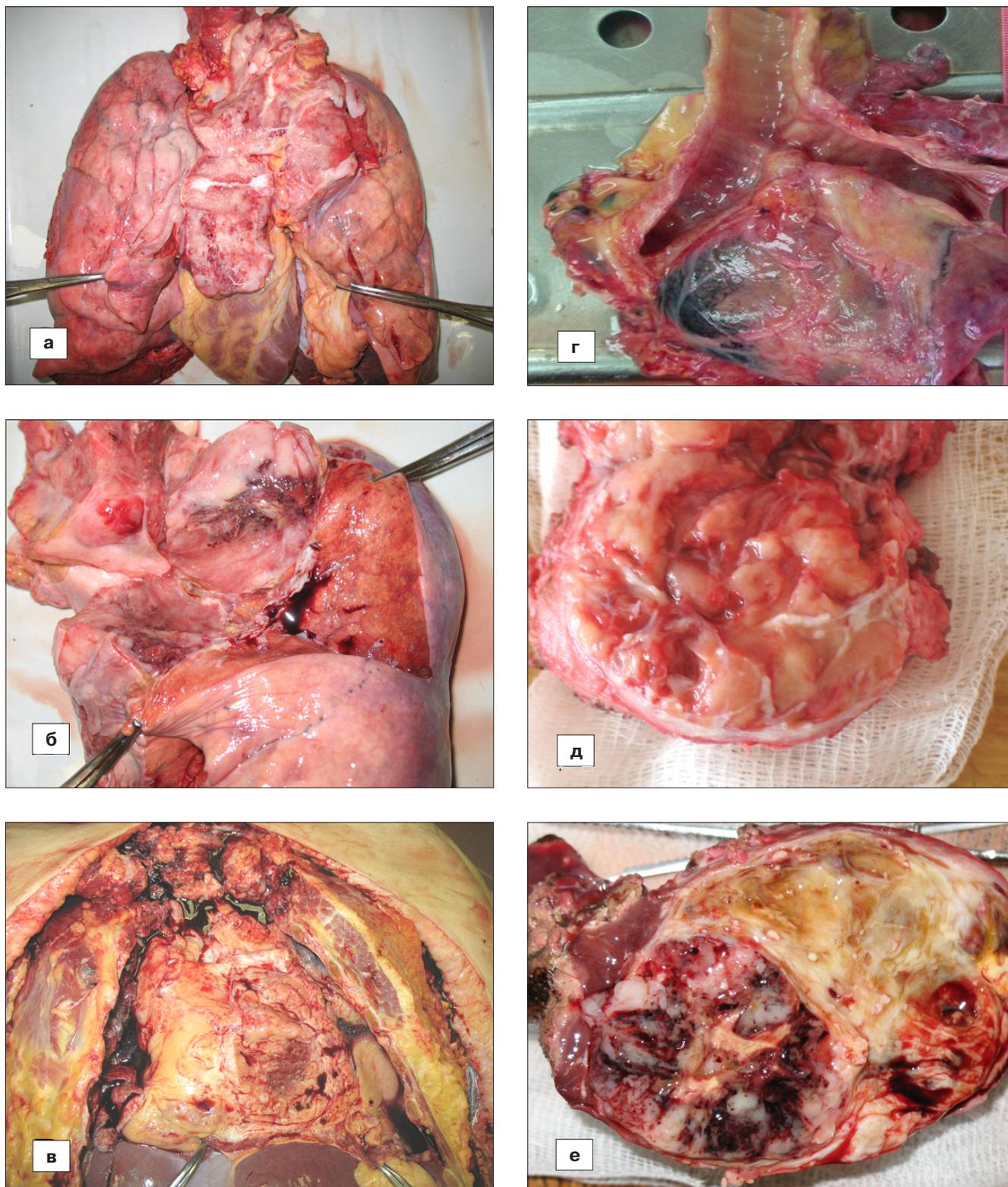


Рис. 1 Воспалительная фибросаркома: внешний вид опухолей.

а – М, 17 лет, опухоль верхнего средостения (в центре);

б – М, 25 лет, опухоль левого гемиторакса (слева), сдавление верхней доли левого легкого (справа);

в – М, 40 лет, опухоль переднего средостения (удален грудино-реберный треугольник), сдавление сосудов сердца;

г – М, 64 года, опухоль заднего средостения, сдавление бронхов;

д – Ж, 25 лет, удаленная опухоль малого таза;

е – Ж, 12 лет, гемигепатэктомия, опухолевый узел в правой доли печени.

Гистологическое строение опухолей

Ткань воспалительной фибросаркомы построена из веретенообразных фибробластов и миофибробластов с биполярными отростками и овальными ядрами с мелкими ядрышками (рис. 2 а). Митотическая активность миофибробластов умеренная и высокая: от 4 до 12 фигур митозов в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$. Среди миофибробластов обнаружены формы с круглыми пузырьковидными ядрами (нейроноподобные клетки) (рис. 2 б), сегментированными ядрами (клетки вида Рида-Штернберга) (рис. 2 в) и рабдоидной морфологией (рис. 2 г). Фибробласты и миофибробласты опухоли формировали прямые и переплетающиеся (вид «елочки») пучки среди коллагеновой стромы. В строме опухоли – «воспалительный» инфильтрат, представленный лейкоцитами, лимфоцитами, плазматическими клетками. В части случаев сформированы реактивные лимфоидные фолликулы. Очаги некроза обнаружены только в одной воспалительной фибросаркоме, их площадь составляла менее 5% ткани опухоли (рис. 2 д). Все опухоли инфильтрировали жировую клетчатку средостения, ткань легкого, печени или адвентициальную оболочку крупных сосудов.

Структура опухолей в метастазах в целом соответствовала таковой в первичных узлах. Опухоли средостения и печени развивались как воспалительные фибросаркомы *de novo*. Опухоль малого таза возникла как классическая воспалительная миофибробластическая опухоль и после двух рецидивов приобрела морфологию воспалительной фибросаркомы и сформировала метастаз.

Специальные методы исследования

При иммуноморфологическом исследовании в миофибробластах воспалительных фибросарком была обнаружена экспрессия виментина (5/5), калпонины (5/5), гладкомышечного актина (3/5), десмина (1/5) и ALK1 (1/5). Индекс пролиферации опухолевых клеток (по экспрессии Ki-67, клон MIB-1) составлял от 10 до 25%.

При FISH исследовании обнаружена транслокация гена ALK одним случае воспалительной фибросаркомы (M/17 лет) (рис. 2 е).

Обсуждение результатов

Первое описание воспалительной миофибробластической опухоли в легком было сделано американскими патологами W. Umiker и A. Iverson в 1954 г. [9]. Позднее сходные по строению опухоли были обнаружены в стенке мочевого пузыря, брыжейке тонкой кишки, сальнике, средостении и мягких тканях конечностей. Длительное время существовали сомнения в клональном характере воспалительной миофибробластической опухоли, и поэтому чаще

использовали термины «воспалительная псевдоопухоль» и «плазмноклеточная гранулема». Кроме плазмноклеточной гранулемы, были выделены еще три варианта строения опухоли – организующая пневмония, фиброгистиоцитарный тип и воспалительная фибросаркома [6, 7]. Несмотря на то что в опухоли преобладает какой-то один гистологический тип, все эти варианты строения можно увидеть в одном препарате. Многоликость морфологической картины и неопределенность критериев морфологической диагностики опухоли привели к тому, что термин «воспалительная миофибробластическая опухоль (воспалительная псевдоопухоль)» превратился в собирательное понятие для разных по этиологии и не имеющих между собой патогенетических связей процессов. К ним относили воспалительные гранулемы, возбудителями которых являлись *Mycobacterium avium intracellulare*, склерозирующие IgG4-зависимые процессы в забрюшинном пространстве и средостении, опухоли селезенки, построенные из фолликулярных дендритных клеток и индуцированные вирусом Эпштейна-Барр, особую форму гиперплазии лимфатических узлов и, наконец, истинные опухоли из фибробластов и миофибробластов [1]. Поражение многих органов, разный возраст больных, многообразие клинического течения и исходов не вносили ясности в проблему трактовки нозологии: опухоль или воспалительный процесс?

Клональный характер воспалительной миофибробластической опухоли был доказан в результате цитогенетических исследований [8]. Установлено, что в патогенезе опухоли важное значение имеет ген рецептора тирозинкиназы анапластической лимфомы (ALK), расположенный на коротком плече хромосомы 2 (2p23). Транслокации гена ALK, самая частая из которых t(2; 5), были обнаружены в 35–60% воспалительных миофибробластических опухолей [4, 8]. Обнаружение транслокаций гена ALK и их продуктов с помощью методов молекулярной генетики (FISH, PCR) и иммуногистохимии (антитело ALK1) стало пробным камнем, с помощью которого удалось разделить истинные воспалительные миофибробластические опухоли и не-опухолевые процессы, сходные по морфологии и клиническим признакам. Источником развития этих опухолей считают недифференцированные мезенхимальные клетки забрюшинного пространства и средостения, фибробласты висцеральной плевры легкого, собственной пластинки слизистой оболочки мочевого пузыря и фасций скелетных мышц [3].

Предположение о том, что существует злокачественная воспалительная миофибробластическая опухоль, было сделано в работе [7]. Изучив в общей сложности двенадцать воспалительных миофибробластических опухолей, авторы выделили в самостоятельную группу четыре опухоли с метастазами в легких и головном мозге. Все опухоли

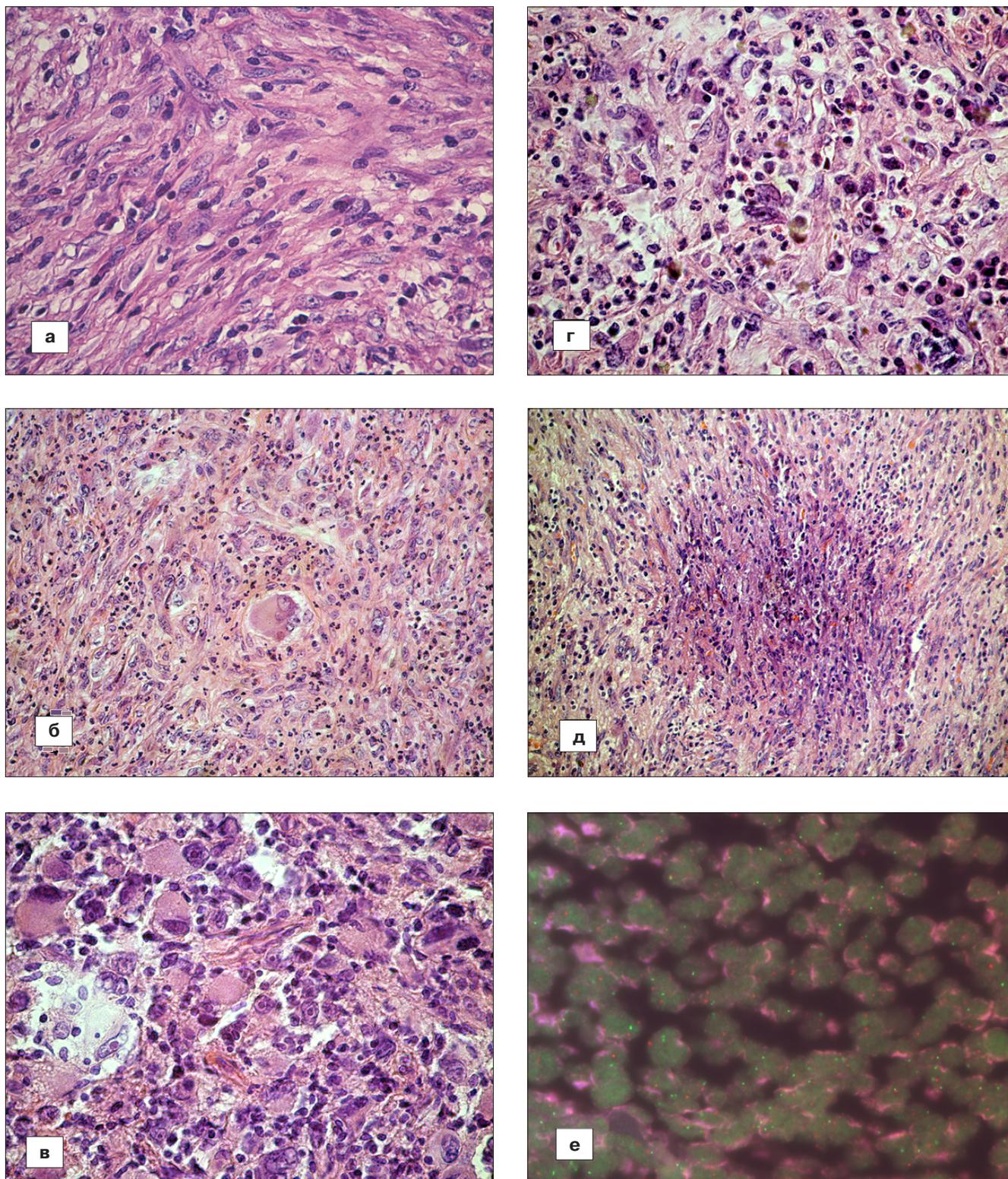


Рис. 2. Воспалительная фибросаркома: гистологическое строение опухоли. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.
 а – веретенообразные миофибробласты, овальные гиперхромные ядра, митозы в ядрах клеток, высокая плотность клеток в пучках;
 б – миофибробласты с овальными ядрами с ядрышками, нейроноподобные клетки;
 в – миофибробласты с овальными ядрами с ядрышками, в части клеток эозинофильная цитоплазма, ядра расположены эксцентрично;
 г – в центре препарата двухъядерная клетка вида Рида-Штернберга;
 д – коагуляционный некроз клеток опухоли;
 е – транслокация гена ALK в клетках опухоли, два отдельных сигнала (оранжевый и зеленый) при гибридизации нуклеотидного зонда с ядрами неопластических миофибробластов (FISH)

локализовались в брыжейке тонкой кишки или в забрюшинном пространстве, представляя, таким образом, «абдоминальный» вариант опухоли. Для них предложили термин «воспалительная фибросаркома», который в дальнейшем распространили на воспалительные миофибробластические опухоли с инфильтративным ростом и/или метастазами, вне зависимости от их локализации.

Более крупное клинико-морфологическое исследование было проведено С. Coffin в 1995 г. [2]. Работа включала 84 наблюдения воспалительной миофибробластической опухоли, при этом не были описаны случаи с метастазами. Был сделан вывод о том, что воспалительная миофибробластическая опухоль — это доброкачественная опухоль, а случаи злокачественного течения представляют собой либо трансформацию («дедифференцировку») опухоли после нескольких рецидивов в фибробластическую саркому, либо мультицентричный рост опухоли в двух органах. Впоследствии эту точку зрения приняли эксперты ВОЗ [3].

К 2010 г. были описаны 27 случаев воспалительной миофибробластической опухоли с метастазами. Больные — мужчины и женщины в возрасте от 5 до 79 лет; возраст 75% больных 10–16 лет. Преобладали наблюдения с локализацией первичного узла опухоли в забрюшинном пространстве и брыжейке тонкой кишки и в легком. Метастазы обнаруживали, с убывающей частотой, в легких, печени, головном мозге и костном мозге. Время появления метастазов составляло от одного месяца до 9 лет. Непосредственные причины смерти этих больных не анализировались. Таким образом, было доказано существование злокачественной воспалительной миофибробластической опухоли (воспалительной фибросаркомы) как самостоятельной нозологической формы.

Ретроспективный анализ свойств воспалительных фибросарком позволил выделить несколько общих, но не специфичных для них признаков [5, 7, 10]. К их числу относятся:

- 1) диаметр узла опухоли более 8 см;
- 2) «атипичная» морфология опухоли — высокая плотность клеток в пучках, атипия ядер, фигуры митозов (более 4 в 10 полях зрения, $\times 400$), наличие нейроноподобных и двухъядерных миофибробластов, очаги некроза;
- 3) анеуплоидия клеток опухоли;
- 4) инфильтративный рост опухоли на границе с нормальной тканью;
- 5) экспрессия в неопластических миофибробластах белка p53;
- 6) отсутствие транслокации гена ALK или транслокация с формированием химерного гена ALK-cysteinil-tRNA (CARS).

Группа из шести наших случаев в целом подтверждает эти закономерности (см. таблицу). Необычным свойством является локализация первичного узла опухоли в средостении (у четырех больных). Все случаи смерти больных связаны с прогрессированием заболевания — ростом узла опухоли и синдромами сдавления органов средостения. При анализе клинических и морфологических данных нами не установлены морфологические признаки воспалительной фибросаркомы (исследованы диаметр опухолевого узла, полиморфизм ядер, количество митозов, наличие очагов некроза, наличие экспрессии Ki-67 и ALK1), которые имели бы значимую корреляцию с частотой рецидивов и появлением метастазов этой опухоли. Зарегистрированы два случая с рецидивами опухоли. Клинико-морфологический анализ рецидивов воспалительной фибросаркомы труден. Практика показывает что по мере увеличения количества рецидивов воспалительная мио-

Таблица. Воспалительная фибросаркома: клинические данные шести наблюдений опухоли

Пол/ Возраст	Локализация опухоли	Размеры узла	Рецидивы, время	Метастазы	Клинический исход
М/17	верхнее средостение, врастание в грудину	9×8 см	1, 3 мес после лучевой терапии	нет	смерть через 11 мес, пневмония
М/25	левый гемиторакс, сдавление левого легкого и легочной артерии	8×6 см	нет	правое легкое	смерть через 8 мес, пневмония
М/40	переднее средостение, сдавление сосудов сердца	12×10 см	нет	легкие	смерть через 14 мес, тромб ВПВ
М/64	заднее средостение, сдавление бронхов	10×8 см	нет	нет	смерть через 7 мес, кахексия
Ж/25	малый таз, врастание в мочевого пузырь	6×5 см	2, 8 и 15 мес после иссечения узла	печень	жива 8 мес после удаления узлов
Ж/12	правая доля печени	7×6 см	нет	правое легкое	жива 6 мес после гемигепатэктомии

фибробластическая опухоль эволюционирует от морфологии классического фиброгистиоцитарного варианта и плазмоклеточной гранулемы к строению высокодифференцированной фибробластической (миофибробластической) саркомы. По этой причине в этих случаях трудно сказать, как возникает воспалительная фибросаркома: *de novo* или путем трансформации из доброкачественной воспалительной миофибробластической опухоли.

Нами не обнаружена в большинстве случаев воспалительных фибросарком транслокации гена ALK и повышенной экспрессии его продуктов (ALK1) в цитоплазме неопластических фибробластов. Данные литературы говорят о том, что транслокации гена ALK наблюдаются, по разным оценкам, в 35–60% воспалительных миофибробластических опухолей, чаще у детей и подростков с локализацией узла в легком [4, 8]. Транслокации гена ALK не были обнаружены в описанных в литературе случаях воспалительных фибросарком, что позволяет говорить о том, что воспалительная миофибробластическая опухоль и воспалительная фибросаркома – разные нозологические формы [10].

Вопрос о способе лечения воспалительных фибросарком остается открытым. Хирургическое иссечение узла опухоли является методом выбора. Инфильтративный рост опухоли в средостении и забрюшинном пространстве не позволяет, в силу технических причин, выполнить радикальную операцию. Частота рецидивов воспалительной миофибробластической опухоли составляет около 25%, а для воспалительной фибросаркомы этот показатель, видимо, выше. Потенциальная возможность развития метастазов и быстрый рост опухоли делают необходимым комбинированный подход сочетания лучевой терапии и химиотерапии. Результаты неудовлетворительны, средняя продолжительность

жизни таких больных после установления диагноза не превышает, по разным данным, полутора лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chan J.K.C. Inflammatory pseudotumor: a family of lesions of diverse nature and etiologies. *Adv. Anat. Pathol.* 1996, v. 3, p. 156–164.
2. Coffin C.M., Watterson J., Priest J.R. et al. Extrapulmonary inflammatory myofibroblastic tumor (inflammatory pseudotumor). A clinicopathologic and immunohistochemical study of 84 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 1995, v. 19, p. 859–872.
3. Coffin C.M., Fletcher J.A. Inflammatory myofibroblastic tumor. In: Fletcher C.D.M., Unni K.K., Mertens F., eds. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. World Health Organization Classification of Tumours.* Lyon: IARC Press. 2001, p. 91–93.
4. Coffin C.M., Patel A., Perkins S. et al. ALK1 and p80 expression and chromosomal rearrangements involving 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumor. *Mod. Pathol.* 2001, v. 14, p. 569–576.
5. Coffin C.M., Hornick J.L., Fletcher C.D.M. Inflammatory myofibroblastic tumor. *Am. J. Surg. Pathol.* 2007, v. 4, p. 509–520.
6. Matsubara O., Tan-Liu N.S., Kenney R.M. et al. Inflammatory pseudotumours of the lung: progression from organizing pneumonia to fibrous histiocytoma or to plasma cell granuloma in 32 cases. *Hum. Pathol.* 1988, v. 19, p. 377–384.
7. Meis J.M., Enzinger F.M. Inflammatory fibrosarcoma of the mesentery and retroperitoneum. A tumor closely simulating inflammatory pseudotumor. *Am. J. Surg. Pathol.* 1991, v. 15, p. 1146–154.
8. Su L.D., Atayde-Perez A., Sheldon S. et al. Inflammatory myofibroblastic tumor: cytogenetic evidence supporting clonal origin. *Mod. Pathol.* 1998, v. 11, p. 364–371.
9. Umiker W.O., Iverson A. Postinflammatory ‘tumor’ of the lung. Report of the four cases simulating xanthoma, fibroma or plasma cell granuloma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1954, v. 28, p. 55–63.
10. Weiss S.W., Goldblum J.R. *Enzinger and Weiss’s Soft Tissue Tumors.* 5^{ed}, Mosby. 2008.

Статья поступила 28.04.2011 г., принята к печати 20.07.2011 г.
Рекомендована к публикации Феденко А.А.

INFLAMMATORY FIBROSARCOMA: A CLINICOPATHOLOGIC STUDY OF 6 CASES

Bliznyukov O.P.¹, Kozlov N.A.²

¹ Russian Roentgen-Radiological Research Center MH, Moscow

² N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

Key words: inflammatory fibrosarcoma, inflammatory myofibroblastic tumor, ALK

Inflammatory fibrosarcoma is very uncommon low grade myofibroblastic tumor. We report the pathologic features of inflammatory fibrosarcoma and outcomes of the 6 patients. The age ranged from 12 to 64 years; 3 patients were younger than 25 year. The diagnosis of inflammatory fibrosarcoma was made by autopsy in 4 patients. 2 patients had local recurrences and 4 patients had distant metastases. Follow-up showed the death of 4 patients during 7–14 month after diagnosis. The tumors were 7–12 cm; sites included the mediastinum (4 patients), pelvis and liver. All tumors showed predominantly the hypercellularity and atypical cytologic features of inflammatory myofibroblastic tumor, however, areas of nuclear enlargement and necrosis were identified. Immunohistochemically, cytoplasmic ALK1 reactivity was seen only in 1 patient. The ALK rearrangement was confirmed by FISH in same case.