

## КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ МИЕЛОИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

## MYELOID MALIGNANCIES

### Новые горизонты цитогенетики при первичном миелофиброзе

**Т.Л. Гиндина, Н.Н. Мамаев, В.В. Байков,  
М.В. Барабанщикова, Е.Н. Николаева, И.А. Петрова,  
И.С. Моисеев, О.В. Пирогова, Ю.Ю. Власова, М.О. Иванова,  
Е.В. Морозова, С.Н. Бондаренко, Б.В. Афанасьев**

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

### New Cytogenetic Approaches in Patients with Primary Myelofibrosis

**TL Gindina, NN Mamaev, VV Baikov,  
MV Barabanshchikova, EN Nikolaeva, IA Petrova,  
IS Moiseev, OV Pirogova, YuYu Vlasova, MO Ivanova,  
EV Morozova, SN Bondarenko, BV Afanas'ev**

R.M. Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Hematology and Transplantation; Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

#### РЕФЕРАТ

**Цель.** Оценить возможности новой технологии цитогенетического исследования у больных первичным миелофиброзом (ПМФ).

**Материалы и методы.** Для изучения цитогенетического профиля опухоли у 11 больных ПМФ (6 женщин и 5 мужчин в возрасте 32–60 лет, медиана 48,6 года) были использованы 48-часовые культуры клеток крови по методу N.R. Singh и соавт. (2013). Для обнаружения хромосомных нарушений применяли GTG-бэндинг, а также различные варианты техники флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

**Результаты.** Частота клеток с аномальным кариотипом в культурах клеток крови была статистически значимо выше, чем в стандартных культурах костного мозга (82 vs 27 %;  $p < 0,01$ ). Полиплоидные клоны были выявлены в культурах крови у 45 % больных. Структурные нарушения обнаружены в хромосомах 1, 3, 6, а также 16 и 17 (по 2 и 1 больному на каждую структурную перестройку соответственно). У большинства пациентов (за исключением одного) изменения в диплоидных и полиплоидных метафазах были идентичными. Частичная трисомия 1q образовалась в результате добавления к материалу 2 нормальных гомологов хромосомы 1 дополнительного материала (1q21–1q44), транслоцированного на короткое плечо хромосомы 6. Создается впечатление, что 1q+, i(17q) и ряд других перестроек хромосом являются вторичными, в то время как вовлечение в перестройки локуса 6p21 может быть первичным дефектом при ПМФ. Впервые описанная и подтвержденная с помощью FISH транслокация t(3;6)(q25;p21) по отношению к основной перестройке — транслокации t(1;6) — должна рассматриваться как вариантная. АллоТГСК у 2 больных с 1q+ оказалась успешной, в то время как у пациентки с прогностически неблагоприятной транслокацией t(3;3)(q21;q26), связанной с гиперэкспрессией гена *EVI1*, имели место проблемы с приживлением трансплантата.

**Заключение.** Цитогенетические исследования в культурах клеток крови позволяют получить важную дополнительную информацию у больных ПМФ.

#### ABSTRACT

**Aim.** To evaluate the potential of a new cytogenetic technique in patients with primary myelofibrosis (PMF).

**Materials and methods.** 48-hour blood cell cultures (according to Singh et al., 2013) were used for cytogenetic study in 11 PMF patients (5 female, 6 men, aged 32–60 years; median 48.6 years). GTG-banding and different types of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques were used for identification of chromosomal aberrations.

**Results.** The incidence of abnormal karyotypes in blood cultures was significantly higher than that in standard bone marrow cultures (82 vs 27 %;  $p < 0.01$ ). The polyploid clones were found in blood cultures of 45 % of patients. Structural chromosomal aberrations were found in chromosomes 6, 1, 3, as well as 16 and 17 (in 2 and 1 patients with each aberration, respectively). In all but one patients these abnormalities in diploid and polyploid metaphases were identical. Partial 1q trisomy resulted from adding of additional (1q21–1q44) material translocated to the short arm of chromosome 5 to the material of 2 normal homologues of chromosome 1. It seems that 1q+, i(17q) and some others chromosomal abnormalities were secondary, whereas 6p21 locus involvement may be a primary defect in PMF. The t(3;6)(q25;p21) translocation described for the first time and confirmed by FISH should be considered a variant of well-known translocation t(1;6). Allo-HSCT in 2 patients with 1q+ was successful, whereas there were problems with engraftment in a female patient with prognostically unfavorable t(3;3)(q21;q26) translocation associated with the *EVI1* gene overexpression.

**Conclusion.** Cytogenetic examinations in blood cultures provide important additional information about PMF patients.

**Ключевые слова:** первичный миелофиброз, 48-часовые культуры клеток крови, цитогенетика.

**Keywords:** primary myelofibrosis, 48-hour peripheral blood cell culture, cytogenetics.

**Получено:** 14 июля 2015 г.

**Принято в печать:** 1 ноября 2015 г.

**Received:** July 14, 2015

**Accepted:** November 1, 2015

*Для переписки:* Татьяна Леонидовна Гиндина, канд. мед. наук, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022; тел.: + 7(812)233-12-43; e-mail: cytogenetics.bmt.lab@gmail.com

*Для цитирования:* Гиндина Т.Л., Мамаев Н.Н., Байков В.В. и др. Новые горизонты цитогенетики при первичном миелофиброзе. Клиническая онкогематология. 2016;9(1):61–9.

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-1-61-69

*For correspondence:* Tat'yana Leonidovna Gindina, PhD, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022; Tel.: + 7(812)233-12-43; e-mail: cytogenetics.bmt.lab@gmail.com

*For citation:* Gindina TL, Mamaev NN, Baikov VV, et al. New Cytogenetic Approaches in Patients with Primary Myelofibrosis. Clinical oncohematology. 2016;9(1):61–9 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-1-61-69

## ВВЕДЕНИЕ

Первичный миелофиброз был описан Густавом Хеуком в 1879 г. [1], а в 1951 г. был включен Вильямом Дамешекком в группу миелолипролиферативных синдромов (болезней) [2]. Благодаря последним достижениям генетики этот синдром сейчас вновь привлекает к себе большое внимание.

Свое современное название «первичный миелофиброз» (ПМФ) заболевание получило недавно. Среди возможных этиологических факторов рассматриваются неблагоприятное влияние внешней среды, включая радиацию, другие потенциальные мутагены, а также генетические особенности пациентов. Под влиянием этих факторов или спонтанно в клетках-предшественниках гемопоэза у части больных ПМФ возникают точечные мутации в генах, имеющих отношение к рецепции и внутриклеточной передаче сигнала, в частности, через активацию сигнального пути STAT. Одна из этих точечных мутаций происходит в гене Янус-киназы 2 (*JAK2*), что приводит к замене в ней валина на фенилаланин в положении 617 и кодируется как *JAK2*<sup>V617F</sup>. Эта мутация имеется более чем у 95 % больных истинной полицитемией, но только не более чем у 50 % пациентов с ПМФ. Контролируемое *JAK2*<sup>V617F</sup> семейство белков STAT активно фосфорилируется [3–6]. При другой (точечной) мутации, которая встречается у больных ПМФ и эссенциальной тромбоцитемией, происходит замена аминокислоты в позиции 515 молекулы рецептора тромбопоэтина с-MPL (W515L, W515K), что также приводит к активации сигнального пути *JAK2*-STAT [4]. Позже было показано, что у больных ПМФ наблюдается гиперэкспрессия локализованного на хромосоме 19 гена *PVR-1* или *NB1*, которые, в свою очередь, ответственны за экспрессию антигена CD177 [7]. Наконец, недавно установлено, что  $\frac{1}{3}$  больных ПМФ свойственны диагностически и патогенетически значимые точечные мутации гена кальретикулина (*CALR*) [3–6].

В отличие от точечных мутаций патогенетическая роль большинства хромосомных аномалий при ПМФ до настоящего времени не уточнена. Стандартная методика цитогенетического исследования с использованием 24-часовых культур клеток костного мозга выявляет изменения хромосом приблизительно у  $\frac{1}{3}$  больных ПМФ.

В силу биологических особенностей ПМФ [8] спектр цитогенетических изменений при этой болезни долгое время был невыраженным. По итогам ранее выполненных

работ [8–15] в список вовлеченных в перестройки были включены хромосомы 1, 3, 7, 8, 9, 11, 13, 17, 21 и 22. Основной акцент делался на повреждения хромосом 3, 1 и 13 [9, 13]. Масштабные цитогенетические исследования при ПМФ были выполнены относительно недавно [16–23]. Они показали, что у этих больных чаще других встречаются делеции длинного плеча хромосом 20, 13 и 11, а также дупликации длинного плеча хромосомы 1. Изолированные делеции 20q– и 13q– имели место только у 14–28 и 8 % этих больных соответственно. В то же время дополнительные изменения хромосом касались трисомий 8, 9 или 21, а также нарушений структуры хромосом 3, 5, 6, 7 и 12. Основные повреждения в хромосоме 20 затрагивали локусы q11.2-13.1, а в хромосомах 13, 1, 6, 7 и 12 — локусы q12-22, q10-25/p10-31, p11-13, p10 и p11-13 соответственно. Полная характеристика выявленных к настоящему времени цитогенетических нарушений в клетках больных ПМФ представлена в табл. 1, заимствованной из обзора К. Hussein и соавт. [18] и дополненной только что опубликованными данными китайских исследователей [22].

Особый вклад в понимание значения характера изменений хромосом при ПМФ внесли новаторские работы G. Castoldi и соавт. [13] и N.R. Singh и соавт. [24], в которых были использованы более длительные (48–96-часовые) нестимулированные культуры клеток крови и костного мозга. Как оказалось, доля свойственных мегакариоцитарным предшественникам полиплоидных митозов в этих условиях была на порядок выше, чем в стандартных культурах костного мозга, а свойственные ПМФ изменения хромосом, как правило, были представлены в полиплоидных метафазных пластинках. Согласно данным австралийских исследователей [24], полиплоидные клоны клеток, в т. ч. тетраплоидные (4n) и смешанные тетра- и октоплоидные (4n/8n), имели место у 6 и 3 пациентов соответственно. При этом обращало на себя внимание, что все тетраплоидные клоны содержали характерную для ПМФ дупликацию хромосомного материала части длинного плеча хромосомы 1 (1q+). Кроме того, у 4 больных было установлено, что наблюдавшийся на этапе прогрессирования полиплоидный клон возникал из первичного диплоидного, зарегистрированного еще на этапе первичной диагностики ПМФ.

В последние годы достигнуты значительные успехи в терапии ПМФ. Они связываются с активным использованием в клинике блокаторов *JAK2*, в частности руксолитиниба [6, 7], и аллогенной трансплантации

**Таблица 1.** Основные нарушения структуры хромосом у больных первичным миелофиброзом\*

Виды нарушения структуры хромосом			
Делеции	Частичные и полные трисомии	Транслокации	Другие нарушения
del(20)(q11)	+1, +1q(partial), +1q, add(1)(p13)	t(1;9)(p10;q10), t(1;12)(q22;q24), t(1;12)(p12;q24), t(1;13)(p12;q12), t(1;13)(p32;p11), t(1;18)(q10;q10), t(1;20)(q32;q13.3), t(1;8)(q12;q23), t(1;9)(q21;q34), t(1;12)(q41;q24), t(1;22)(q23;q13)	i(17)(q10), i(21)(q10), i(1)(q10), i(9)(p10)
del(13)(q11?q14)	+2, add(2)(p13), der(2)t(2;11)(q24q31;q13)	t(2;11)(p13;q21), t(2;12)(p13;q14), t(2;4), der(2)t(2;6), t(2;3)(p12;q27)	
-5/5q-	+3, der(3)t(3;3)(p25;q23)	t(3;9), t(3;21)(q22;q23)	inv(3), inv(12)(p12q24)
-7/7q-	+4	t(4;12)(q33;q21), t(4;12)(p14;q15), t(4;13)(q25;q12), t(4;9)(p25;p24)	ins(4;11)(q27;q24q2?)
del(12)(q12q24), -12, del(12)(q14?q21)	+5, dup(5), der(5)t(1;5)(q21;p15)	t(5;12)(p14;q21), t(5;13)(q13;q32), t(5;7)(q32;q21), t(5;9)	dic(13;13), (q1?;p11)
-1, -2, del(3)(p13-21), -4	+6, add(6)(p11.2), add(6)(p23)	der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3), der(6)t(1;6)(q25;p25), t(6;10)(q27;q11), t(6;16)(p21;q22), t(6;22)(p22;q11), t(6;14)(q27;q21)	Тетра- и октоплоидия со структурными изменениями хромосом
-6, del(6)(p23), del(6)(q21.3)	+7, add(7)(q3)	der(1;7)(q10;p10), t(7;12)(p11;q24), t(7;12)(q22;q24.1), t(7;17)(p15;q22)	
del(8)(q23), del(9)(q22;q35)	+8, add(8)(p21), +9, add(9)(q22)	t(8;9)(p22;p24.1), der(9;18)(p10;p10), t(9;21)(p23;q11)	
-9, -10	+10, +11	t(10;20)(q26;q11)	
-11, del(11)(q11), del(11)(q21q24)	+12, add(12)(q15-26)	t(12;12)(q?;q?), t(12;13)(p12;q13), t(12;16)(q24;q24), t(12;17)(q24;q11), t(12;17)(q13;p11), t(11;12)(p14;p13), t(11;12)(q13;q11)	
-13, del(14)(q21), -15	+13, add(13)(q1), +14, 14q+	t(13;15)(q14;q22), t(13;17)(q31;q22), t(13;11)(p11;p11), t(14;18)(q32;q23)	
-17, -18, der(18)(q21)	+17, add(17)(p11.2), +18, add(18)(p11), +19	der(18)t(9;18)(p13;p11)	i(17q)
-20, -21	+20, +21/21p+, +X, +Y, +r		

\* За основу взята сводная таблица из работы К. Hussein и соавт. [18], которая была расширена за счет данных В. Li и соавт. [22].

гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) [7, 25–28].

В настоящей работе представлены и обсуждаются недавно полученные нами данные по цитогенетике больных ПМФ, наблюдавшихся в НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой. Наши исследования не только подтверждают замечательные находки австралийских ученых, но и дополняют их.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего обследовано 26 больных ПМФ, в т. ч. 15 — по стандартной методике краткосрочного 24-часового культивирования клеток костного мозга (1-я группа) и 11 — с использованием 48-часовой нестимулированной культуры клеток крови (2-я группа). Неродственная аллоТГСК была выполнена у 4 больных.

При цитогенетическом исследовании анализировали не менее 20 GTG-окрашенных метафазных пластинок. Идентификация хромосомных перестроек осуществлялась в соответствии с последней версией Международной цитогенетической номенклатуры хромосом человека [29]. Для уточнения хромосомных аномалий применяли метод флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с цельнохромосомными ДНК-зондами и ДНК-зондами для многоцветного бэндинга, проведенный по протоколам производителя (MetaSystems, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В 1-й группе аномальный кариотип был обнаружен у 4 (27 %) из 15 больных (все мужчины). Число хромосом у них было диплоидным ( $n = 1$ ), псевдодиплоидным ( $n = 1$ ) или околодиплоидным ( $n = 2$ ). Числовые нарушения за-

ключались в трисомии 8 и моносомии 7, а полиплоидные митозы не встречались. Структурные нарушения имели место только у 2 больных и заключались в несбалансированных транслокациях t(1;15) и t(1;19), приводящих к частичной дупликации длинного плеча хромосомы 1.

Основные клинические и лабораторные данные больных 2-й группы представлены в табл. 2. Возраст больных варьировал от 32 до 60 лет с медианой 48,6 года. Аномальный кариотип был обнаружен у 9 (82 %) из 11 больных, причем у 5 (№ 4, 8–11; 45 %) пациентов имели место тетра- и октоплоидные наборы хромосом. В неплоидных митозах численные изменения хромосом заключались в трисомиях 8 (№ 6) и 13 (№ 11). Что касается структурных перестроек хромосом, в них чаще вовлекались хромосомы 3 (№ 4 и 5), 6 (№ 8 и 10) и 1 (№ 9 и 10) (рис. 1 и 2), реже — хромосомы 16 (№ 9) и 17 (№ 11).

Структурные изменения в диплоидных и полиплоидных митозах, за исключением 1 наблюдения, были идентичными. В то же время у 1 больной (№ 9) вовлечение в перестройки хромосом 1 и 16 с дупликацией 1q имело место только в клетках с диплоидными кариотипами.

Поскольку транслокации t(1;16) и t(3;6) ранее в работах, посвященных ПМФ, не были описаны, мы проанализировали их также с помощью FISH. В первом наблюдении продемонстрирована несбалансированная транслокация t(1;16), которая приводила к увеличению в клетках количества длинных плеч хромосомы 1 (см. рис. 2). Что касается транслокации t(3;6), она была обнаружена как в диплоидных, так и тетра- и октоплоидных митозах, причем в полиплоидных была кратно мультиплицирована (рис. 3 и 4).

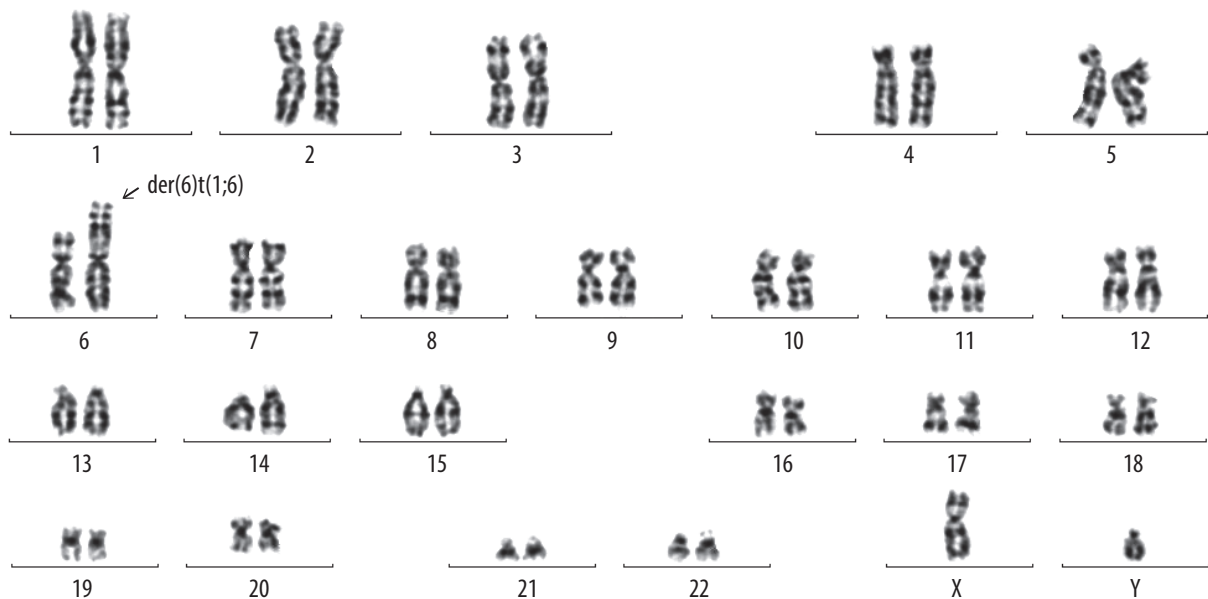
У другого больного с предшествующим лечением (№ 11) все исследованные клетки крови содержали дополнительную хромосому 13 и i(17)(q10) (рис. 5),

**Таблица 2.** Основные клинико-лабораторные данные и результаты цитогенетического исследования клеток из 48-часовых нестимулированных культур крови больных первичным миелофиброзом

Пациент №	Возраст (лет), пол	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Селезенка, см	Кариотип	Дата, тип ТГСК (продолжительность жизни в днях после выполнения)
1	32, ж	150	36,0	740	17,0 $\times$ 8,3	46,XX[20]	
2	37, ж	146	4,5	800	16,7 $\times$ 6,6	46,XX[20]	
3	40, м	64	29,0	3100	11 $\times$ 26	92,XXYY[5]/46,XY[15]	
4	46, м	118	19,0	191	19 $\times$ 15	46,XY, inv(3)(q21q26)[8]/46,XY[12]	
5*	47, ж	100	70,0	88	20 $\times$ 9	46,XX, t(3;3)(q21;q26)[20]	11.02.15 г., 14.05.15 г., алло (80)
6	50, ж	189	22,0	268	20 $\times$ 10	47,XX, +8[12]/94,XXXX, +8x2[6]/46,XX[2]	
7	53, ж	—	—	—	—	92,XXXX[4]/46,XX[16]	
8	55, м	104	41,0	268	22 $\times$ 12	46,XY, der(6)t(3;6)(q25;p21)[11]/92,XXYY, der(6)t(3;6)x2[5]/184,XXXXYYYY, der(6)t(3;6)x4[2]/46,XY[2]	
9*	57, ж	111	6,4	256	20,0 $\times$ 8,7	46,XX, der(16)t(1;16)(q21;p13)[5]/92,XXXX[5]/46,XX[10]	12.03.15 г., алло (109)
10	58, м	60	30,0	450	17 $\times$ 12	46,XY, der(6)t(1;6)(q21;p21)[16]/46,XY [4]	23.04.15 г., алло (60)
11	60, м	100	9,0	80	18 $\times$ 10	46,XY, i(17)(q10)[6]/47,idem, +13[14]	23.06.15 г., алло (6)

Прочерк означает отсутствие данных.

\* Больные, получившие руксолитиниб.



**Рис. 1.** Кариограмма клетки крови больного № 10, иллюстрирующая характерную для первичного миелофиброза несбалансированную транслокацию, приводящую к дупликации длинного плеча хромосомы 1

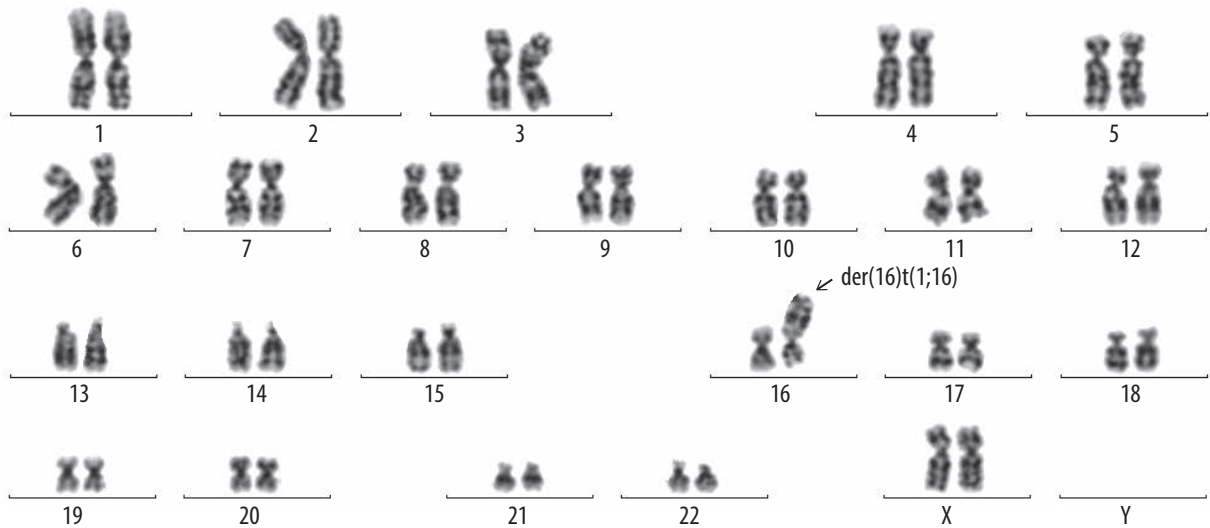
**Fig. 1.** Karyogram of blood cell of patient No. 10 illustrating unbalanced translocation leading to duplication of the long arm of chromosome 1 typical for the primary myelofibrosis

которые характерны как для миелолипролиферативных, так и лимфолипролиферативных заболеваний и считаются прогностически неблагоприятными.

Неродственная аллоТГСК была выполнена у 4 больных, в т. ч. у 2 с предшествующим лечением руксолитинибом (№ 5 и 9). Трансплантация оказалась успешной у всех пациентов, хотя период посттрансплантационного наблюдения (30–120 дней) пока слишком мал. В качестве иллюстрации успешной цитогенетической диагностики у больных, получавших лечение руксолитинибом и аллоТГСК, приведены краткие выписки из историй болезни 2 пациентов с поздними стадиями ПМФ.

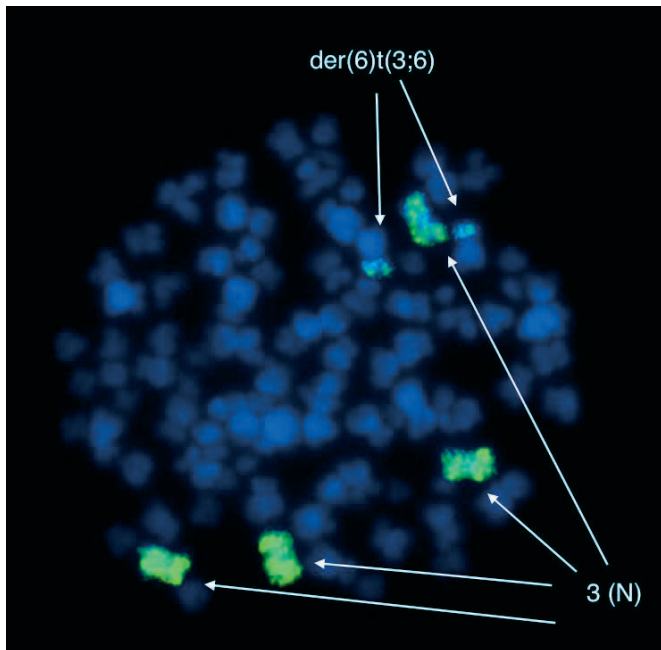
#### КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ № 1

Больная (№ 11), 57 лет. Знает о своем заболевании с декабря 2010 г., когда стала ощущать тяжесть и боль в левом подреберье. По данным УЗИ выявлена спленомегалия (размеры селезенки 200  $\times$  109 мм). В общем анализе крови 21.12.2010 г.: гемоглобин — 111 г/л, эритроциты —  $4,17 \times 10^{12}/\text{л}$ , тромбоциты —  $256 \times 10^9/\text{л}$ , лейкоциты —  $6,4 \times 10^9/\text{л}$ . В лейкоцитарной формуле: миелоциты — 2 %, метамиелоциты — 2 %, палочкоядерные нейтрофилы — 9 %, сегментоядерные нейтрофилы — 52 %, эозинофилы — 1 %, моноциты —



**Рис. 2.** Кариограмма клетки крови больной № 9, иллюстрирующая несбалансированную транслокацию  $t(1;16)(q21;p13)$ , приводящую к дупликации длинного плеча хромосомы 1

**Fig. 2.** Karyogram of blood cell of patient No. 9 illustrating unbalanced  $t(1;16)(q21;p13)$  translocation leading to duplication of the long arm of chromosome 1



**Рис. 3.** Подтверждение несбалансированной транслокации  $t(3;6)(q25;p21)$  методом FISH с целыхромосомным зондом WCP3 к хромосоме 3 в тетраплоидной метафазной пластинке. Стрелками отмечены четыре хромосомы 3-й пары, а также содержащие их хромосомный материал два деривата хромосомы 6  $der(6)t(3;6)$

**Fig. 3.** Confirmation of unbalanced  $t(3;6)(q25;p21)$  translocation using FISH technique with whole chromosome probes WCP3 to chromosome 3 in tetraploid metaphase plate. Arrows point to four chromosomes of the third pair and two derivatives of chromosome 6 ( $der(6)t(3;6)$ ) containing their chromosome material

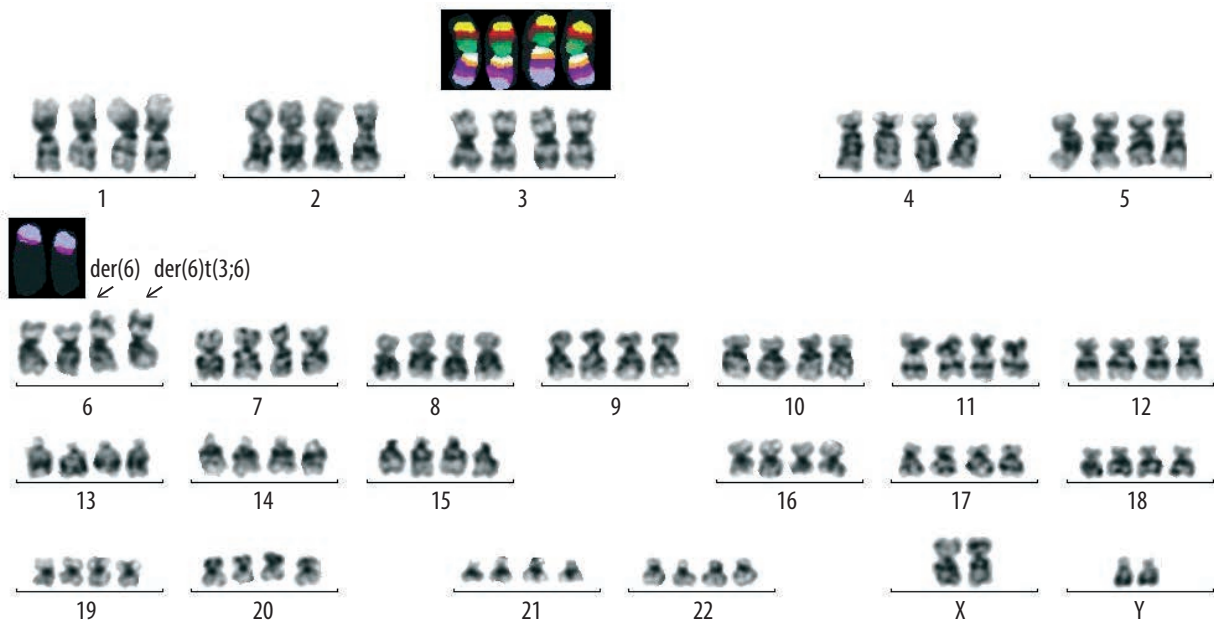
7 % и лимфоциты — 27 %. Пунктат костного мозга 24.12.2010 г. беден клеточными элементами. Эритроидный и гранулоцитарный ростки сужены. Содержание лимфоцитов 31,6 %. Мегакариоциты единичные в препарате.

Трепанобиопсия костного мозга 02.03.2011 г.: костномозговые трабекулы преимущественно утолщены,

пазухи имеют причудливую форму. В большей части пазух сформирован существенный ретикулиновый и коллагеновый фиброз, среди которого «замурованы» в умеренном количестве хаотично расположенные элементы ростков кроветворения. В небольшой части пазух фиброз выражен меньше, а пазухи до 75 % заполнены кроветворной тканью, расположенной среди фиброза сплошными полями. В ней преобладают элементы омоложенного гранулоцитарного роста с признаками созревания до сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов. Количество этих клеток увеличено. Эритроидный росток незначительно сужен, клетки расположены хаотично. Количество мегакариоцитов увеличено, достигает 30–40 в пазухе. Они различаются по величине и форме, локализуются преимущественно паратрабекулярно. Заключение: патоморфологическая картина соответствует первичному миелофиброзу на этапе его перехода из клеточной фазы в фиброзную стадию.

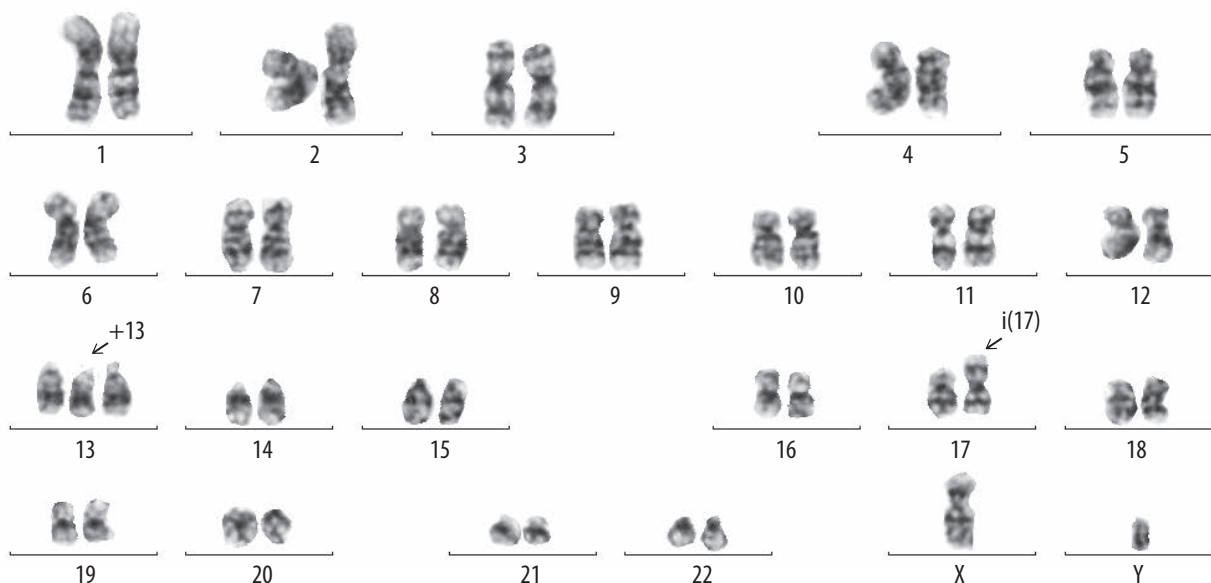
С начала 2011 г. пациентка получала гидроксимочевину. На контрольном УЗИ 23.01.2013 г. печень: краниокаудальный размер (ККР) — 98 мм; косой вертикальный размер (КВР) — 165 мм; селезенка 203 × 87 мм. В миелограмме 28.02.2013 г.: костный мозг беден клеточными элементами. Мегакариоциты — единичные в препарате. Кроветворение по нормобластическому типу. Содержание недифференцированных бластов 1,3 %, промиелоцитов — 0,6 %, миелоцитов — 6,3 %, метамиелоцитов — 1,3 %, палочкоядерных нейтрофилов — 12,5 %, сегментоядерных нейтрофилов — 34,4 %, базофилов — 0,4 %, моноцитов — 7,5 % и лимфоцитов — 23,1 %. Уровень ферритина плазмы 13.11.2013 г. составлял 96,4 нг/мл.

С декабря 2013 г. проводилась терапия интерфероном- $\alpha$  в дозе 3 000 000 МЕ п/к 3 раза в неделю (переносимость плохая из-за озноба, гипертермии, слабости и снижения аппетита). Общий анализ крови 24.01.2014 г.: гемоглобин — 97 г/л, эритроциты —  $3,15 \times 10^{12}/л$ , лейкоциты —  $4,5 \times 10^9/л$ , тромбоциты —  $131 \times 10^9/л$ , бластные клетки — 5 %, миелоциты — 9 %, палочкоядерные нейтрофилы —



**Рис. 4.** Кариограмма тетраплоидной клетки из 48-часовой нестимулированной культуры клеток крови больного № 8, иллюстрирующая дупликацию двух дериватов хромосомы 6, образование которых обусловлено несбалансированной транслокацией  $t(3;6)(q25;p21)$ , приводящей к секстапликации части длинного плеча хромосомы 3 (GTG-кариограмма, дополненная многоцветным бэндингом хромосомы 3)

**Fig. 4.** Karyogram of tetraploid cell from 48-hour unstimulated blood cell culture of patient No. 8 illustrating duplication of two derivatives of chromosome 6, which is formed due to unbalanced  $t(3;6)(q25;p21)$  translocation leading to sixplication of a part of the long arm of chromosome 3 (GTG-karyogram supplemented with multicolored banding chromosome 3)



**Рис. 5.** Кариограмма клетки крови больного первичным миелофиброзом (№ 11), иллюстрирующая наличие трисомии 13 и изохромосомы 17q

**Fig. 5.** Karyogram of a blood cell of patient No. 11 with primary myelofibrosis illustrating the presence of trisomy 13 and 17q isochromosome

14 %, сегментоядерные нейтрофилы — 33 %, базофилы — 1 %, моноциты — 9 % и лимфоциты — 29 %. Нормобласты в крови составляли 6/100. Интерферон- $\alpha$  был отменен в марте 2014 г., возобновлен прием гидроксимочевины. На этом этапе больную консультировали в НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, где было проведено высокоразрешающее HLA-типирование и начат поиск неродственного донора. Трепанобиопсия с целью рестадирования выполнена 22.07.2014 г. Заключение: картина первичного миелофиброза, MF3, очаговый остеомиелосклероз.

При стандартном цитогенетическом исследовании костного мозга был обнаружен нормальный кариотип 46,XX, а при молекулярно-генетическом исследовании выявлена мутация ( $del\ 52\ b.p.\ L367is\ X46$ ) в экзоне 9 гена кальретикулина. С целью подготовки к аллотГСК в течение 2 мес. проводилось лечение руксолитинибом в дозе 30 мг/сут. Терапия была прервана из-за снижения тромбоцитов до  $60 \times 10^9/л$ . Цитогенетическое исследование из 48-часовых нестимулированных культур клеток крови выявило не отмеченную ранее несбалансированную транслокацию  $t(1;16)$ , в которую вошел дополнительный

материал длинного плеча хромосомы 1 (1q21–1q44), т. е. в диплоидных клетках крови этой больной обнаружена частичная дупликация длинного плеча хромосомы 1, характерная для ПМФ. В тетраплоидных метафазах эта аномалия не обнаружена. Обобщенный кариотип клеток выглядел следующим образом: 46,XX, der(16)t(1;16)(q21;p13)[5]/92,XXXX[5]/46,XX[10].

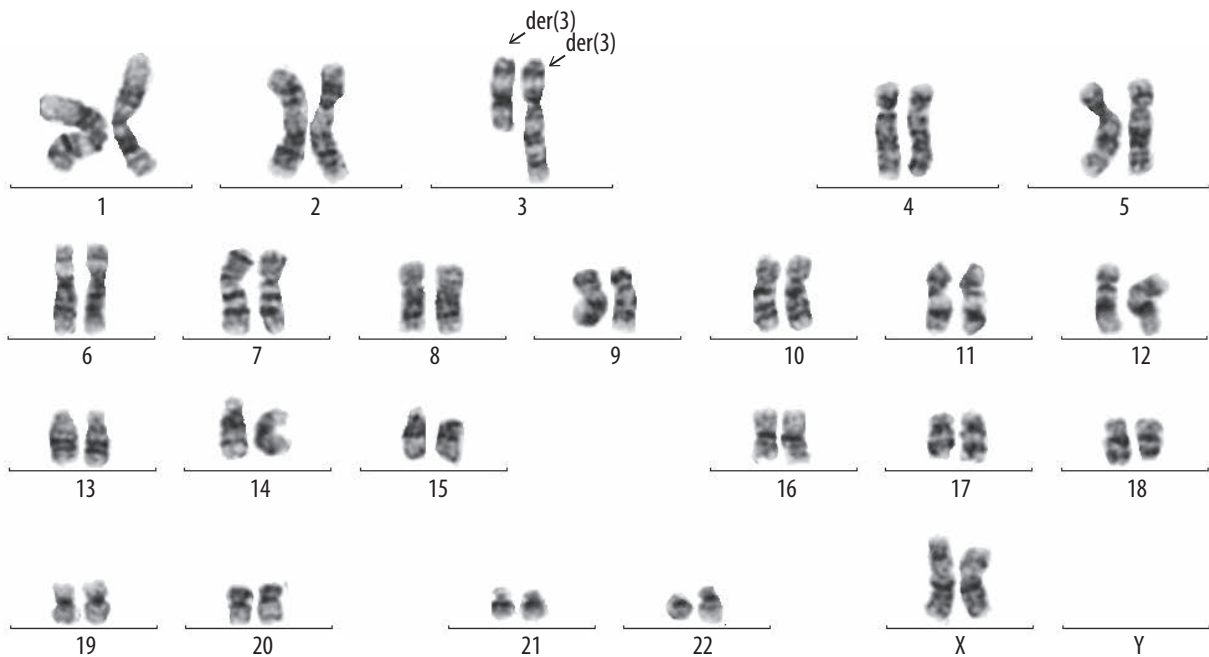
АллоТГСК от HLA-совместимого неродственного донора была выполнена 12.03.2015 г. с введением больной  $5,1 \times 10^9$  CD34-позитивных клеток/кг массы тела. Приживление наступило в ожидаемые сроки. Донорский химеризм все время находился в пределах 97–99 %. Важный 100-дневный посттрансплантационный рубеж больная преодолела. Основными осложнениями посттрансплантационного периода стали инфекции. Активное наблюдение за больной продолжается.

### КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ № 2

Больная (№ 5), 47 лет. Впервые узнала об изменениях в крови в 2011 г., когда при плановом обследовании были выявлены увеличение количества лейкоцитов до  $30 \times 10^9/\text{л}$  и тромбоцитоз (уровень неизвестен). По этому поводу сначала к врачам не обращалась. При обследовании в марте 2013 г. по поводу нейтрофильного лейкоцитоза и тромбоцитоза обнаружена мутация в гене *JAK2* в концентрации 8,08 %. Цитогенетическое исследование и определение экспрессии гена *BCR/ABL* не проводились. Первоначально заболевание расценено как эссенциальная тромбоцитемия и лечение проводилось интерфероном- $\alpha$ . В июне 2013 г. из-за непереносимости интерферона стала получать гидроксимочевину, иматиниб. С декабря 2013 г. отмечено ухудшение самочувствия, нарастающая общая слабость, снижение массы тела, выявлены сплено- и гепатомегалия. В анализах крови: гемоглобин — 47–100 г/л, тромбоциты —  $51–88 \times 10^9/\text{л}$

и лейкоциты —  $35–75 \times 10^9/\text{л}$ . Данные трепанобиопсии (16.01.14 г.): костный мозг гиперклеточный с гиперплазией гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков. Гранулоцитарный росток расширен на всех стадиях дифференцировки со значительным преобладанием зрелого пула клеток. Количество мегакариоцитов увеличено. Они полиморфны по размеру и форме с преобладанием клеток большого и крупного размера с гипо- и гиперлобулярными ядрами. Эритроидный росток расширен очагами. Интерстициально встречаются разрозненные мелкие лимфоидные клетки и плазмocyты. При окрашивании по Гомори фиброз MF1 с участками MF2. Кариотип 46,XX,t(3;3)(q21;q26)[20] (рис. 6). Методом FISH гена *BCR/ABL* не обнаружено. Уровень ферритина в плазме достигал 2000 мкг/л. Больная получала деферазирокс, к которому в октябре 2014 г. был добавлен руксолитиниб в дозе 10–15 мг/сут. В результате уровень ферритина снизился до 693 мкг/л, имело место снижение уровня лейкоцитов. Размеры селезенки оставались прежними. При дополнительном обследовании перед аллоТГСК методом МРТ и КТ были выявлены переломы тел VIII, X и XII грудных позвонков, потребовавшие ношения бандажа и приема толперизона.

АллоТГСК от неродственного донора была выполнена 11.02.2015 г. Режим кондиционирования миелоаблативный, содержащий флударабин и бусульфан. Профилактику РТПХ осуществляли тимоглобулином, такролимусом и микофенолата мофетилем. Количество перелитых CD34-позитивных клеток крови составляло  $6,5 \times 10^6/\text{кг}$  массы тела. Приживления трансплантата на Д+23 не зарегистрировано. Донорский химеризм был равен 40–50 %. Позднее (31.03.2015 г.) было зафиксировано увеличение селезенки и печени, что указывало не только на неприживление трансплантата, но и на прогрессирование заболевания. В связи с этим было принято решение о проведении повторной аллоТГСК от того же



**Рис. 6.** Кариограмма клетки крови больной (№ 5) первичным миелофиброзом, иллюстрирующая прогностически неблагоприятную транслокацию t(3;3)(q21;q26), приводящую к гиперэкспрессии гена *EV11*

**Fig. 6.** Karyogram of a blood cell of patient No. 5 with primary myelofibrosis illustrating prognostically unfavorable t(3;3)(q21;q26) translocation leading to *EV11* overexpression

донора, которая была выполнена 14.05.2015 г. Режим кондиционирования миелоаблативный с флударабином и тресульфаном в дозе 12 г/м<sup>2</sup>/сут. Источник трансплантата — гемопоэтические стволовые клетки крови в количестве  $11,4 \times 10^6$ /кг массы тела. Приживление трансплантата проходило с большой задержкой. Основные осложнения терапии: инвазивный микоз, бактериальная пневмония и энтеропатия, связанные с резистентной к терапии *Klebsiella pneumoniae*.

Несмотря на тяжесть состояния, обусловленную как неприживлением трансплантата, так и инфекционными осложнениями, обсуждался вопрос о проведении третьей аллотГСК. В последней миелограмме (04.06.2015 г.) в период стойкой глубокой лейкопении (лейкоциты менее  $0,1 \times 10^9$ /л) и нейтропении при малой клеточности костного мозга недифференцированные бластные клетки составили 63,5 %, миелобласты — 1 %, промиелоциты — 2,5 %, миелоциты — 1 %, метамиелоциты — 0,5 %, палочкоядерные нейтрофилы — 2 %, сегментоядерные нейтрофилы — 2 %, лимфоциты — 1,5 %, моноциты — 3 %, плазмциты — 1 %, эритробласты — 1 %, нормобласты базофильные — 0,5 %, тучные клетки — 0,5 % и макрофаги — 20 %. Это послужило основанием для цитолога высказать предположение о трансформации ПМФ в острый лейкоз. Однако в последующих анализах крови количество лейкоцитов возросло до  $0,8 \times 10^9$ /л, общее самочувствие стало улучшаться, что, скорее всего, указывало на приживление трансплантата.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на трудности в получении аспирата костного мозга для цитогенетического исследования у больных ПМФ, накопленный к настоящему времени материал в этой области представляется впечатляющим. На основании данных ранних работ сложилось впечатление о преимущественном вовлечении в перестройки хромосом 1, 3, 5–7, 11–13, 17 и 20 (см. табл. 1), прогностическая значимость которых при ПМФ была показана неоднократно [30–35]. Согласно опубликованным данным, успешные цитогенетические исследования костного мозга до последнего времени удавалось проводить лишь у 15–30 % пациентов [16–23]. Результаты работы удалось существенно улучшить недавно, когда для цитогенетического анализа стали использовать 48-часовые нестимулированные культуры крови [24]. Эти исследования показали, что в культурах клеток крови у больных с поздними стадиями ПМФ нередко наблюдается увеличенное содержание метафаз с тетра- и октоплоидными наборами хромосом, содержащими свойственные ПМФ основные структурные и числовые изменения хромосом. То, что митозы с тетра- и октоплоидными наборами хромосом принадлежат предшественникам мегакариоцитов, сомнений у исследователей не вызывает. Однако частота выявленных таким образом структурных нарушений хромосом в нашем и австралийском исследованиях [24] оказалась различной. В частности, по данным австралийских коллег, приобретение дополнительного материала 1q из-за несбалансированных транслокаций было отмечено у 6 (67 %) из 9 обследованных больных с полиплоидным кариотипом, причем существенно чаще в самих полиплоидных клетках. В то же время на нашем материале несбалансированные транслокации

с участием в перестройках хромосомы 1 имели место только у 2 (14 %) пациентов, причем у одной из них как в клетках с полиплоидными, так и диплоидными наборами хромосом.

Создается впечатление, что большая часть неслучайных повторяющихся изменений хромосом при ПМФ, в частности +1q, t(inv(3;3) и i(17q), скорее всего, вторична и возникает на фоне проведенной ранее терапии. В то же время вовлечение в перестройки локуса 6p21, с учетом данных изучения однонуклеотидных полиморфизмов в геноме с помощью микрочипов, может быть первичным хромосомным дефектом [24]. В нашем предтрансплантационном материале эта перестройка была обнаружена лишь у 2 (14 %) из 14 больных, включая наблюдения впервые встретившейся вариантной транслокации t(3;6)(q25;p21). К настоящему времени у человека в локусе 6p21 обнаружено более 300 разных генов [36]. Какой или какие из них могут быть вовлечены в патогенез ПМФ, пока неясно.

Обнаружение сложных неслучайных хромосомных изменений в клетках из нестимулированных 48-часовых культур клеток крови больных ПМФ дает основание связать их с наличием в циркуляции ранних мегакариоцитарных предшественников. В свою очередь, данное обстоятельство может быть весомым аргументом в пользу прогрессирования заболевания [24] и необходимости лечения таких больных с выполнением аллотГСК.

К настоящему времени в мире у больных ПМФ успешно выполнено около 1000 трансплантаций [25, 28]. В нашей клинике приживление трансплантата было достигнуто у всех пациентов, причем у двух (№ 9 и 10) с наличием в кариотипе 1q+. В то же время в 1 наблюдении (№ 5), где приживление трансплантата было достигнуто со второй попытки, у больной имела место прогностически неблагоприятная транслокация t(3;3)(q21;q26), сопровождавшаяся гиперэкспрессией гена *EVII*.

Таким образом, у больных ПМФ цитогенетические исследования из нестимулированных 48-часовых культур клеток крови представляются более продуктивными, поскольку при таком подходе появляется возможность разграничить длительно протекающие и склонные к прогрессированию варианты заболевания. Полученные в ходе исследования цитогенетические данные могут использоваться при выборе дальнейшей лечебной тактики.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** Т.Л. Гиндина.

**Сбор и обработка данных:** М.В. Барабанщикова, И.С. Моисеев, О.В. Пирогова, Ю.В. Власова, М.О. Иванова, Е.В. Морозова.

**Предоставление материалов исследования:** Т.Л. Гиндина, В.В. Байков, И.А. Петрова, Е.С. Николаева.

**Анализ и интерпретация данных:** Т.Л. Гиндина, Н.Н. Мамаев, В.В. Байков.



**Подготовка рукописи:** Т.Л. Гиндина, Н.Н. Мамаев, В.В. Байков.

**Окончательное одобрение рукописи:** Б.В. Афанасьев, С.Н. Бондаренко.

**Административная поддержка:** Б.В. Афанасьев.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность компании MetaSystems в лице Андрея Владимировича Зацепина за техническую поддержку исследования.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Heuck G. Zwei Falle von Leukämie mit eigenhümlichem Blut-resp Knochenmarkbefund. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin.* 1879;78(3):475–96. doi: 10.1007/bf01878089.
2. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood.* 1951;6(4):372–5.
3. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013;369:2379–90. doi: 10.1056/nejmoa1311347.
4. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia.* 2014;28:1472–7. doi: 10.1038/leu.2014.3.
5. Panagiota V, Thol F, Markus B, et al. Prognostic effect of calreticulin mutations in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2014;28:1552–5. doi: 10.1038/leu.2014.66.
6. Komrokji RS, Seymour JF, Roberts AW, et al. Results of a phase 2 study of pacritinib (SB1518), a JAK2/JAK2 (V617F) inhibitor, in patients with myelofibrosis. *Blood.* 2015;125(17):2649–55. doi: 10.1182/blood-2013-02-484832.
7. Hoffman R, Rondalli D. Biology and treatment of primary myelofibrosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007:346–54. doi: 10.1182/asheducation-2007.1.346.
8. Geraedts JP, den Ottolander GJ, Ploem JE, Muninghe OG. An identical translocation between chromosome 1 and 7 in three patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 1980;44:569–75. doi: 10.1111/j.1365-2141.1980.tb08711.x.
9. Bernstein R, Pinto MR, Behr A, Mendelow B. Chromosome 3 abnormalities in acute non-lymphocytic leukemia (ANLL) with abnormal thrombopoiesis: report of three patients with a "new" inversion anomaly and a further case of homologous translocation. *Blood.* 1982;60:613–7.
10. Clare N, Elson D, Mannhof L. Cytogenetic studies of peripheral myeloblasts and bone marrow fibroblasts in acute myelofibrosis. *Am J Clin Pathol.* 1982;77:762–6. doi: 10.1093/ajcp/77.6.762.
11. Borgstrom GM, Knutila S, Ruutu T, et al. Abnormalities of chromosome 13 in myelofibrosis. *Scand J Haematol.* 1984;33:15–21.
12. Miller JB, Testa JR, Lindgren V, Rowley JD. The pattern and clinical significance of karyotypic abnormalities in patients with idiopathic and postpolycythemic myelofibrosis. *Cancer.* 1985;55:582–91. doi: 10.1002/1097-0142(19850201)55:3<582::aid-cnrc2820550318>3.0.co;2-o.
13. Castoldi G, Cuneo A, Tomasi P, Ferrari L. Chromosome abnormalities in myelofibrosis. *Acta Haematol.* 1987;78(Suppl 1):104–8. doi: 10.1159/000205913.
14. Smadja N, Krulik M, de Gramont A, et al. Cytogenetic studies in twelve patients with primary myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1987;24:151–8. doi: 10.1016/0165-4608(87)90092-6.
15. Demory JL, Dupriez B, Fenaux P, et al. Cytogenetic studies and their prognostic significance in agnogenic myeloid metaplasia: a report of 47 cases. *Blood.* 1988;72:855–9.
16. Djordjevic V, Dencic-Fekete M, Jovanovic J, et al. Cytogenetics of agnogenic myeloid metaplasia: a study of 61 patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;173:57–62. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2006.09.02.
17. Hidaka K, Shide K, Shimoda H, et al. The impact of cytogenetic abnormalities on the prognosis of primary myelofibrosis: a prospective survey of

202 cases in Japan. *Eur J Haematol.* 2009;83:328–33. doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01298.x.

18. Hussein K, Van Dyke DL, Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. *Am J Hematol.* 2009;82:329–38. doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01224.x.

19. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia.* 2011;25:82–8. doi: 10.1038/leu.2010.234.

20. Tefferi A, Lasho TL, Jimma Th, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: The Mayo clinic experience. *Mayo Clin Proc.* 2012;87(1):25–33. doi: 10.1016/j.mayocp.2011.11.001.

21. Wassie E, Finke Ch., Gangat N, et al. A compendium of cytogenetic abnormalities in myelofibrosis: molecular and phenotypic correlates in 826 patients. *Br J Haematol.* 2014; doi: 10.1111/bjh.132. doi: 10.1111/bjh.13260.

22. Li B, Xu J, Li Ch, et al. Cytogenetic studies and their prognostic contribution in 565 Chinese patients with primary fibrosis. *Am J Hematol.* 2014;89(11):1043–7. doi: 10.1002/ajh.23824.

23. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Первичный миелофиброз: собственный опыт и новое в диагностике и лечении. *Онкогематология.* 2015;10(2):26–36.

[Abdulkadyrov KM, Shuvaev VA, Martynkevich IS. Primary myelofibrosis: own experience and news from diagnostic and treatment. *Onkogematologiya.* 2015;10(2):26–36. (In Russ)]

24. Singh NR, Morris ChM, Koleth M, et al. Polyploidy in myelofibrosis: analysis by cytogenetic and SNP indicates association with advancing disease. *Mol Cytogenet.* 2013;6:59–71. doi: 10.1186/1755-8166-6-59.

25. Devine SM, Hoffman R, Verma A, et al. Allogeneic blood cell transplantation following reduced-intensity conditioning is effective therapy for older patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 2002;99:2255–8. doi: 10.1182/blood.v99.6.2255.

26. Kroger N, Zabelina T, Schieder H, et al. Pilot study of reduced-intensity conditioning followed by allogeneic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelofibrosis. *Br J Haematol.* 2005;128:690–7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05373.x.

27. Merup M, Lazarevic V, Nahi H, et al. Different outcome of allogeneic transplantation in myelofibrosis using conventional or reduced-intensity conditioning regimens. *Br J Haematol.* 2006;135:367–73. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06302.x.

28. Kroger N, Holler E, Kobbe G, et al. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 2009;114:5264–70. doi: 10.1182/blood-2009-07-234880.

29. Schaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. *ISCN. An international System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Basel: S. Karger; 2013.

30. Tefferi A, Dingli D, Li C, Dewald GW. Prognostic diversity among cytogenetic abnormalities in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer.* 2005;104:1656–60. doi: 10.1002/cncr.21358.

31. Strasser-Weiple K, Steurer M, Kees M, et al. Chromosome 7 deletions are associated with unfavorable prognosis in myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood.* 2005;105(10):4146. doi: 10.1182/blood-2004-11-4319.

32. Hussein K, Huang J, Lasho T, et al. Karyotype complements the International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis. *Eur J Haematol.* 2009;82:256–9. doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01216.x.

33. Hussein K, Pardanani AD, Van Dyke DL, et al. International Prognostic Scoring System-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. *Blood.* 2010;115:496–9. doi: 10.1182/blood-2009-08-240135.

34. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. DIPSS Plus: a refined dynamic international prognostic scoring system for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol.* 2011;29(4):392–7. doi: 10.1200/jco.2010.32.2446.

35. Vaidya R, Caramazza D, Begna KH, et al. Monosomal karyotype in primary myelofibrosis is detrimental to both overall and leukemia-free survival. *Blood.* 2011;117(21):5612–5. doi: 10.1182/blood-2010-11-320002.

36. Huret JL. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.* Poitiers: University Hospital; 2011. pp. 5. doi: 10.4267/2042/44590.

