

НОВІ ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПІДХОДИ ДО МОНІТОРИНГУ МІЄЛОФІБРОЗУ

¹Державна установа «Інститут патології крові та трансфузійної медицини

Національної академії медичних наук України» (м. Львів)

²Державна установа «Інститут спадкової патології

Національної академії медичних наук України» (м. Львів)

r_lozynsky@ukr.net

Дана робота є фрагментом НДР «З'ясувати нові прогностичні фактори перебігу BCR-ABL негативних хронічних мієлопроліферативних неоплазій і розробити принципи їх ризик адаптованої терапії» (термін виконання 2014-2016 рр.) № державної реєстрації 0114u003143.

Вступ. Згідно останніх досліджень, етіологічними чинниками, які запускають патологічний процес при хронічних мієлопроліферативних захворюваннях (МПЗ) є мутації певних відомих генів. У понад 90% хворих із ідіопатичним мієлофіброзом (МФ) й есенціальною тромбоцитемією, та у всіх хворих на справжню поліцитемію захворювання характеризується пошкодженням одного з трьох основних генів: *JAK2*, *CALR* і *MPL*. Однак, перебіг МПЗ за наявності лише одної мутації є контрольованим і може тривати значно більше 10-ти років. Натомість, при появі додаткових аномалій значно погіршується прогноз захворювання, зокрема, через вищий ризик трансформації в гостру лейкемію. Це можуть бути цитогенетичні аномалії, які є незалежними прогностичними маркерами, зокрема: поява комплексного каріотипу, трисомії 8-ої хромосоми, моносомії 7-ої, 5-ої хромосом, делецій 7q, 5q, 12p, інверсії 3-ої хромосоми, або перебудов у ділянці 11q23, виникнення ізохромосоми i(17q) [12]. Також негативно відбиваються на динаміці протікання МПЗ мутації деяких окремих генів, зокрема *ASXL1*, *EZH2*, *IDH2*, *TP53* та ін. [11]. При цьому виявлення багатьох клінічно значущих мутацій потребує застосування технічно складних та дорогих методик секвенування значного числа генів, які важко впровадити в рутинну клінічну практику. На даний час розроблені системи прогнозування МФ – IPSS та DIPSS, які дозволяють оцінити ризик несприятливого перебігу захворювання у конкретного хворого, а отже, підібрати оптимальне лікування. Шкала IPSS використовується на час встановлення діагнозу. Наявність кожного з 5-ти характерних для МФ симптомів оцінюється за цією шкалою 1-м балом, відсутність – нулем. До таких симптомів належать: вік понад 65 років, рівень гемоглобіну менше 100 г/л, лейкоцитоз понад 25×10^9 /л, бласти в периферійній крові (ПК) не менше 1%, наявність загальної симптоматики визначеної за спеціальними опитувальниками (зокрема, схуднення, біль, слабкість та ін.). Нуль балів означає низький ризик несприятливого перебігу захворювання, тако-

го як трансформація в гостру лейкемію чи смерть; один бал означає проміжний ризик-1; два бали – проміжний ризик-2; три і більше – високий ризик. Інша шкала – DIPSS – використовується у динаміці для моніторингу стану хворого. Її відмінність полягає у присвоєнні хворому в випадку низького рівня гемоглобіну (менше 100 г/л) не 1-го, а 2-х балів. При цьому наявність низького ризику та проміжного ризику-1, аналогічно до шкали IPSS, констатується при сумі балів 0 і 1, відповідно. Натомість як проміжний ризик-2 визначають випадки з сумою балів від 2 до 3, а високий – не менше, ніж 4 бали. Зараз користуються новішими модифікаціями вищезгаданих шкал: IPSS-Plus та DIPSS-Plus, у яких до критеріїв, які дозволяють віднести хворого до високої групи ризику, додано наступні симптоми: несприятливий каріотип, тромбоцитопенія менше 100×10^9 /л, або ж залежність від трансфузій еритроцитів [3].

Враховуючи значення каріотипу, використовувати ці сучасні шкали неможливо без проведення цитогенетичного дослідження, яке стандартно проводиться із використанням матеріалу, отриманого при пункціях кісткового мозку (КМ). МФ характеризується частим утрудненням успішної аспірації КМ під час пункції через фіброзування та відмову хворого проходити болісне інвазивне обстеження, іноді повторне, через недостатню кількість набраного матеріалу при першій пункції. Таким чином є актуальним питання зменшення інвазивності при встановленні діагнозу та моніторингу перебігу МФ. Раціональний і доступний моніторинг МФ є важливим задля швидкого виявлення прогностично несприятливих змін і корекції схеми лікування (зокрема, прийняття рішення щодо скерування хворих для проведення аlogenної трансплантації кісткового мозку).

Мета дослідження. Розробити малоінвазивну доступну методику цитогенетичного моніторингу в хворих на мієлофіброз.

Об'єкт і методи дослідження. У дослідженні брало участь 34 хворих із клінічно підтвердженим діагнозом ідіопатичного МФ, пост-СП та пост-ЕТ вторинним МФ, які проходили амбулаторне або стаціонарне лікування в м. Львові. Діагноз встановлювали за критеріями ВООЗ, прийнятими у 2008 році. Усі хворі потребували специфічної терапії. Зокрема, чотирьом з них проводилася терапія рекомбінант-

ним людським інтерфероном-альфа-2b (ІФН), решта хворих отримували гідроксисечовину для корекції гіперпроліферативних проявів або для гальмування прогресування спленомегалії. Прийом препаратів із цитотоксичною дією припиняли за 3-7 діб до забору матеріалу для цитогенетичного дослідження периферичної крові (ПК) та КМ. ПК культивували *in vitro* протягом 24 годин з використанням гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (Г-КСФ) філграс-тиму, для стимуляції мітотичного поділу циркулюючих стовбурових клітин, бластних клітин та інших незрілих мієлоїдних попередників за авторським методом (заявка на винахід України № а201505498 від 04.06.2015 р.). Препарати кісткового мозку готували за стандартними методиками [1,5]. Застосовували G-метод диференційного забарвлення.

Результати дослідження та їх обговорення. У КМ та ПК 13 (38,2%) хворих було виявлено цитогенетичні аномалії. Спектр найбільш поширених аномалій, знайдених у цьому дослідженні, складали делеції та транслокації 1-ої хромосоми, делеції 5q і 20q, трисомії 3-ої, 8-ої, 9-ої, 12-ої хромосом, моносомії 3-ої, 5-ої, 7-ої, 9-ої, 11-ої, 13-ої, 15-ої, 17-ої хромосом та поліплоїдія. Каріотип Г-КСФ-стимульованої ПК співпадав із каріотипом КМ у більшості хворих. Спостерігалися лише незначні відмінності у співвідношеннях аномальних клітинних клонів при мозаїчних каріотипах.

Кров є цікавим об'єктом для цитогенетичної діагностики, оскільки не потребує інвазивних пункцій кісткового мозку, який при МФ є часто малоклітинним, що спричиняє труднощі в заборі матеріалу на дослідження. Також вивчення пулу циркулюючих клітин дозволяє оцінити поширення певних патологічних клонів, які забезпечують взаємозв'язок і метастатичний обмін патологічним субстратом між різними неопластичними популяціями клітин КМ окремих кісток, печінки, селезінки та інших уражених органів. Як відомо, рівень циркулюючих стовбурових клітин підвищується із прогресуванням МФ [8]. Однак, концентрація уражених патологічним процесом клітин у крові все ж є переважно суттєво нижчою, ніж у кістковому мозку. Тому цитогенетичні препарати без адекватної стимуляції отримати не вдавалося. Використання Г-КСФ дозволяє забезпечити більшу кількість клітин для аналізу в цитогенетичному препараті, оскільки цей природний цитокін людини потужно подразнює переважно мієлоїдний паросток кровотворення (в меншій мірі еритроїдний та мегакаріоцитарний), зумовлюючи посилення проліферації клітин [9].

Цитогенетичне дослідження стимульованої Г-КСФ крові виявилось успішним у більшості пацієнтів нашої групи, які мали «сухий» кістковий мозок і зумовлену цим недостатчу матеріалу в аспіраті КМ. Мітотична активність в досліджених зразках із додаванням Г-КСФ була достатньо високою, щоб отримати метафази для цитогенетичного аналізу в 20 (71%) пацієнтів із МФ, навіть якщо при пункції кісткового мозку не вдавалося набрати необхідну кількість аспіраційного матеріалу для цитогенетичного дослідження. Також оскільки із застосуванням Г-КСФ не стимулюється проліферація Т-лімфоцитів крові, що не уражені неопластичним процесом і не чутливі

до нього, підвищується вибірковість в оцінці стану патологічних клітин при МФ [4]. Так як при МФ уражаються клітини переважно мієлоїдного, а також еритроїдного та мегакаріоцитарного паростків кровотворення, використання Г-КСФ *in vitro* для стимулювання патологічно змінених клітин є патогенетично обґрунтованим. Додавання цього цитокіна робить можливим приготування цитогенетичних препаратів при МПЗ не лише з КМ, а й з ПК. Мітотичний поділ незрілих мієлоїдних клітин, який активується під дією Г-КСФ, зокрема, стовбурових, може дозволити виявити циркулюючі клітини-носії прихованих мутацій, що є потенційними попередниками нових патологічних клонів, в тому числі трансформованих лейкоемічних, ще до початку їх фенотипового прояву в клінічній картині МФ.

У жодному зі зразків ПК, які не стимулювалися Г-КСФ, не виявлено мітотичної активності, тому лише у 5 хворих на МФ з нашої групи каріотип ПК досліджувався без використання цього цитокіна. Високий мітотичний індекс у препаратах ПК з хромосомними аномаліями клінічно супроводжувався вищим індексом IPSS, який дорівнював двом балам, або ж перевищував цю цифру. Також у цьому випадку індекс DIPSS був не меншим трьох балів.

Якщо аспірація КМ для цитогенетичного аналізу була невдалою, однак при цьому цитогенетичні аномалії були виявлені в ПК, перебіг захворювання був несприятливим у зв'язку з появою трансфузійної залежності, збільшенням лейкоцитозу, наростанням змін у лейкоцитарній формулі, або й навіть трансформацією в гостру лейкемію і смерть. Спостереження протягом одного року показали, що цитогенетичні зміни в ПК зберігалися або ж еволюціонували з появою додаткових хромосомних аномалій і погіршенням стану пацієнта. На **рис. 1 А** позначено домінуючий первинний клон 65-річної JAK2V617F-позитивної хворої на ідіопатичний МФ з каріотипом: 47,XX,del5q12.1-qter,+mar1,+mar2,-9. У подальшому каріотип цієї хворої еволюціонував із появою нового клітинного клона (**рис. 1 В**), який виник через один рік від часу першого цитогенетичного дослідження Г-КСФ-стимульованої периферичної крові, каріотип: 45,XX,del5q12.1-qter,+mar1,+mar2,-9,-13,-15. За цей час у хворої значно збільшилася залежність від трансфузій відмитих еритроцитів, наростала кількість бластів у крові, зросли розміри печінки та селезінки. Варто зазначити, що при повторних пункціях кісткового мозку з різних локусів аспірувати кістковий мозок у цієї хворої не вдавалося.

У 8-ми хворих достатньої кількості метафазних клітин у зразках не було виявлено, незважаючи на використання стимуляції Г-КСФ-ом, в тому числі й у тих 4 хворих, які лікувалися ІФН понад 6 місяців. Відсутність мітотичної активності в клітинах ПК всіх хворих, які попередньо отримували лікування ІФН, дозволяє зробити припущення, що даний препарат краще гальмує еволюцію патологічних клонів при МФ, порівняно з гідроксисечовиною. Ці дані співзвучні з публікаціями щодо можливості ІФН призводити до гістологічної регресії МФ [10] та спричинення молекулярних відповідей при інших МПЗ [6].

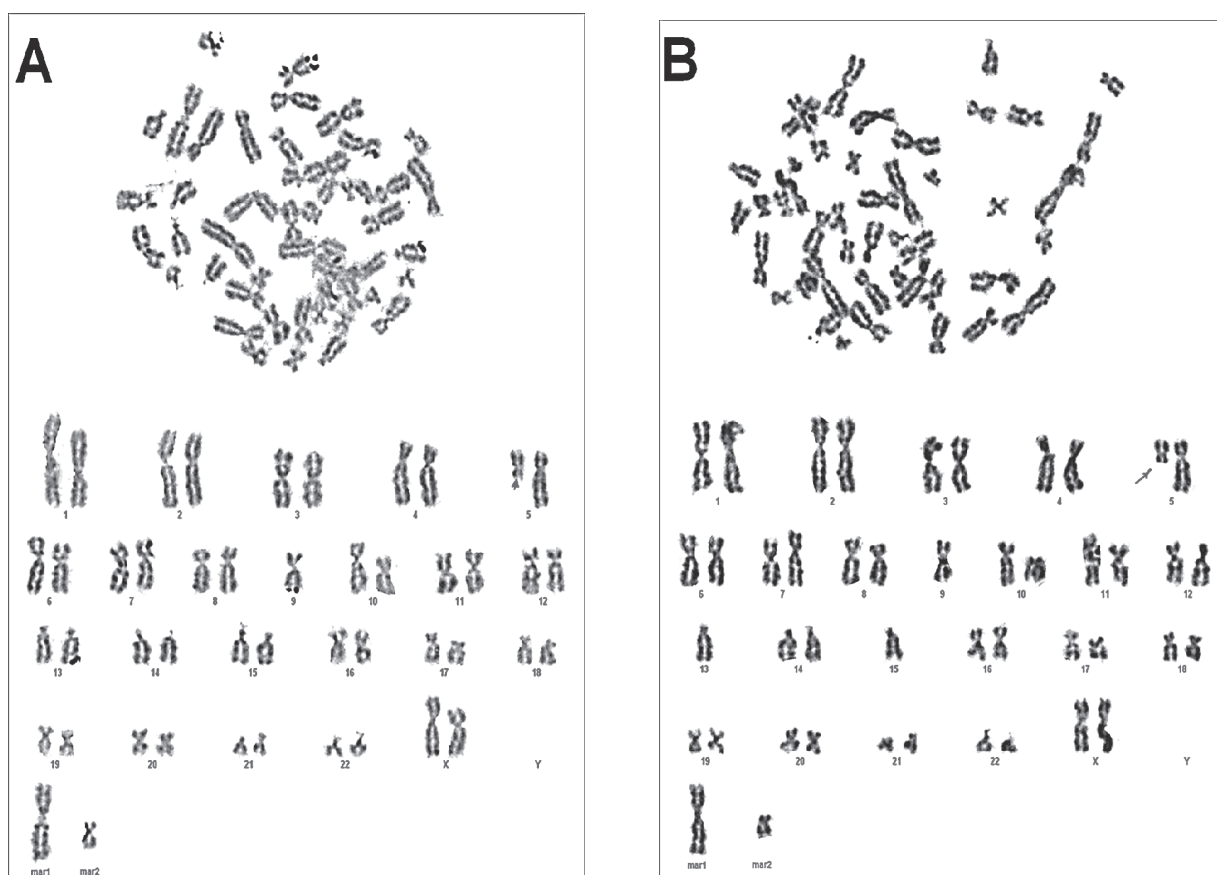


Рис. 1. Еволюція каріотипу периферичної крові у хворої на ідіопатичний мієлофіброз високого ризику за індексом DIPSS.
A – домінуючий клітинний клон при першому цитогенетичному дослідженні периферичної крові.
B – новий патологічний клон, який з'явився після 1 року спостереження.

Важливо відзначити, що в хворих не спостерігалося наростання симптомів захворювання під час паузи у лікуванні перед цитогенетичним дослідженням, що може вказувати на безпечність частішого моніторингу цитогенетичних змін ПК. Виживання хворих за час спостереження не відрізнялося від даних інших авторів [3,6,12].

Було відмічено цікаву особливість каріотипу хворих МФ, яка є більше характерною для солідних пухлин людини, ніж для гематологічних неоплазій – досить високу частоту епізодичної появи поліплоїдії. Дане явище було дещо більш характерним для КМ, оскільки виявлялося в більшій кількості метафазних пластинок хворих, тоді як у ПК поліплоїдні клони становили менший відсоток у загальній клітинній популяції в цитогенетичних препаратах. Зокрема, поліплоїдія ПК могла бути представленою змінами з недоведеною клональністю, наприклад 1 поліплоїдною метафазною пластинкою, а, натомість, у КМ деяких хворих всі метафазні пластинки були поліплоїдними.

Більшість випадків поліплоїдії характеризувалася тетраплоїдними каріотипами. Рідше зустрічалися каріотипи з наборами хромосом, наближеними до тетраплоїдних, триплоїдних та октаплоїдних. Поява поліплоїдних клонів може бути пов'язана з внутрішнім захисним механізмом, спрямованим на збереження

патологічних мутантних клонів, оскільки при наростанні плоідності збільшується кількість копій генів, наявних у клітині. На **рис. 2** зображено каріограму поліплоїдної клітини в каріотипі жінки 72 років, із попередньо виявленою мутацією *JAK2V617F*. Попри наявність тетраплоїдного клона, виявленого в кількості трьох метафаз, у хворої домінував клон з нормальним каріотипом.

З відкриттям ролі мутацій генів *JAK2*, *MPL*, *CALR*, *ASXL1* та цілої групи інших (*TET2*, *DNMT3A*, *EZH2*, *U2AF1*, *CHEK2*, *TP53*, *SF3B1*, *IDH1*, *NFE2*, *SRSF2*, *CBL*, *IDH2*, *SH2B3*) при МФ виникла спокуса створити виключно молекулярно-генетичну класифікацію МПЗ. Однак, попри важливе значення для встановлення діагнозу та прогнозування виживання хворих із такими мутаціями, до цього часу не вдається чітко пов'язати рівень експресії цих ушкоджених генів з природною динамікою перебігу захворювання, а також пояснити відмінності перебігу хвороби в різних хворих із однаковим мутаційним статусом. Тим не менше, використання засобів, які дають можливість у деяких випадках отримати молекулярну відповідь (ІФН, інгібітори *JAK2*), дозволяють розглядати кількісне визначення мутаційного навантаження в хворого як потенційно цікавий маркер загальної ефективності терапії в окремих пацієнтів, переважно на ранніх

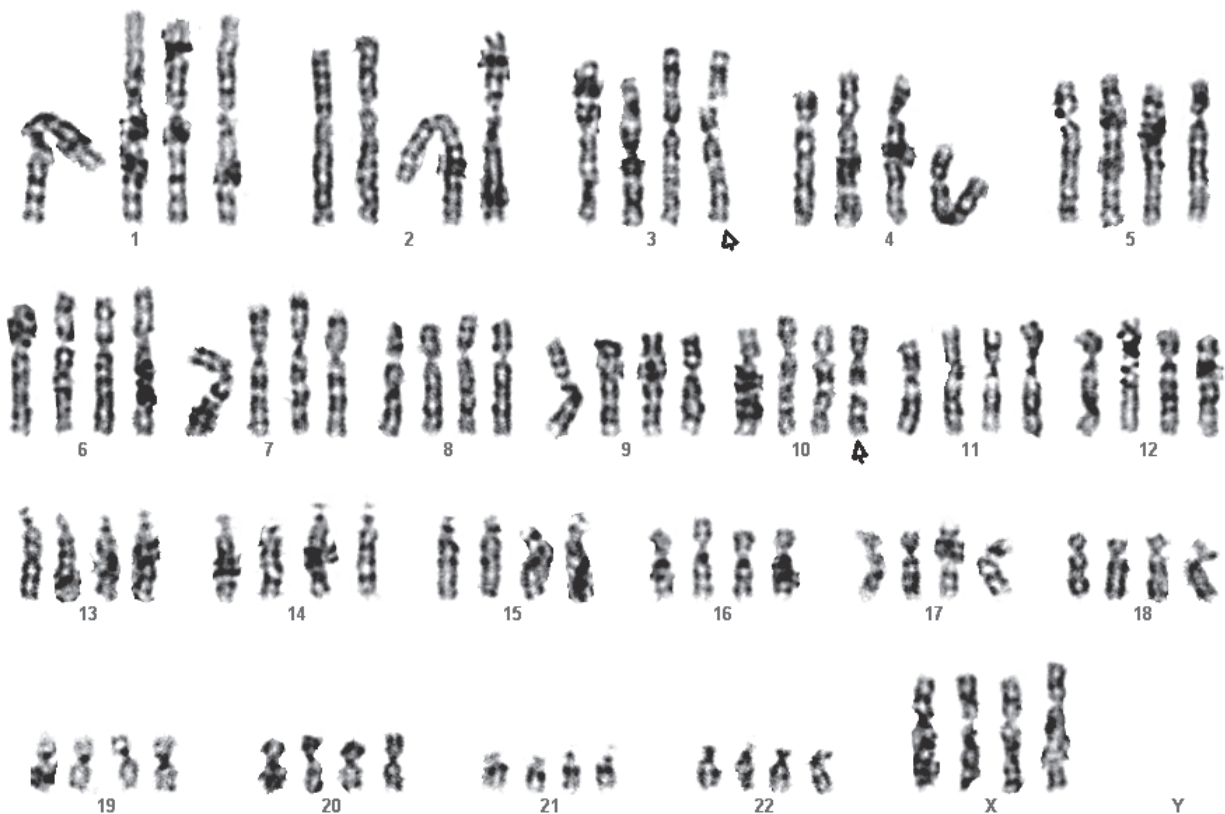


Рис. 2. Поліплоїдна клітина хворої на ідіопатичний мієлофіброз, віком 72 роки. В 3-й і 10-й хромосомах виявлено розриви хроматид. Кариотип: 46,XX[9]/92,XXXX[3].

стадіях захворювання [7]. Визначення мутаційного статусу генів із використанням секвенування екзонів відомих генів є дуже дорогим методом, а отже, виглядає економічно недоцільним при доступних на даний час технологіях. Однак виявлення мутацій *JAK2V617F*, *MPLW515L/K*, для яких не обов'язкове секвенування, при порівняно невеликій вартості виявлення і широкому спектрі охоплення популяції хворих, зберігають високе прогностичне значення та є ключовими для підтвердження діагнозу. Мутації гена *CALR* 1-го і 2-го типів також можуть бути економічно та медично обґрунтованими для виявлення в хворих з підозрою на МФ, враховуючи їх значну частоту в хворих та важливу роль у прогнозуванні перебігу хвороби. Цікавою ідеєю для визначення та моніторингу деяких мутацій, які потребують секвенування, є розроблення імуноспецифічних барвників проти патологічно зміненого білкового продукту гена, яку було нещодавно запропоновано Vannucchi та спів. [2].

Висновки

Зростання ролі молекулярно-генетичних досліджень при МФ все ж не дозволяє на даному етапі обійтися без визначення кариотипу хворого. Спектр аномалій, отриманих за допомогою цитогенетичного аналізу Г-КСФ-стимульованої ПК і КМ практично співпадає. Виявлені цитогенетичні аномалії в крові хворих супроводжувалися несприятливим перебігом МФ. Таким чином, дослідження ПК, стимульованої доступними в клінічній практиці препаратами філґрастиму є прийнятною альтернативою повторним пункціям КМ у разі значного фіброзу, який утруднює

або й унеможливорює отримання достатньої кількості аспірату КМ. Забір ПК для цитогенетичного аналізу в динаміці є перспективним щодо отримання цінної додаткової інформації для регулярного моніторингу ефективності лікування і прогресування захворювання, що допоможе виявити несприятливі аномалії до погіршення загального стану хворого. Регулярне кариотипування може допомогти адекватно рекласифікувати пацієнта з МФ за шкалою DIPSS-Plus та вчасно змінити лікувальну тактику, скерувати його на аlogenну трансплантацію стовбурових клітин, або рекомендувати взяти участь у клінічних дослідженнях перспективних препаратів. Накопичення даних щодо цитогенетичних змін у динаміці при МФ може мати ще й теоретичне значення, допомагаючи встановити нові хромосомні локуси, де розміщуються кандидатні гени, що беруть участь у прогресуванні захворювання, сприятиме кращому розумінню патогенезу і швидшому прогресу в лікуванні даного захворювання.

Перспективи подальших досліджень

Дослідження взаємозв'язку виявлених цитогенетичних аномалій з експресією та мутаціями генів, які мають прогностичне значення при МФ, зокрема *JAK2*, *MPL*, *CALR*, *ASXL1* та ін. Недостатньо вивчений механізм дії ІФН та інших препаратів без прямої алікуючої дії при терапії мієлофіброзу, в тому числі на кариотип. Враховуючи дані щодо пригнічення мітотичної активності в зразках крові у хворих, які отримували ІФН, можна припустити високий потенціал цього препарату в етіотропному лікуванні МФ.

Література

1. Захаров А. Ф. Хромосомы человека. Атлас / А. Ф. Захаров, В. А. Бенюш, Н. П. Кулешов. // М.: Медицина, 1982. С.179-181.
2. Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value / A.M. Vannucchi, G. Rotunno, N. Bartalucci [et al.] // *Leukemia*. – 2014. – vol. 28. – P. 1811-1818.
3. Gangat N. DIPSS Plus: A Refined Dynamic International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis That Incorporates Prognostic Information From Karyotype, Platelet Count, and Transfusion Status / N. Gangat, D. Caramazza, R. Vaidya, G. George, K. Begna [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2011. – № 4. – P. 392-397.
4. Growth Factors and in Health and Disease. Vol. 2B. Ed.: D. Leroith, C. Bondy. JAI Press LTD, London: 1997. – P. 576-577.
5. Hungerford D. A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl / D. A. Hungerford // *Stain Technol.* – 1965. – Vol. 40 (6). – P. 333-338.
6. Molecular responses and chromosomal aberrations in patients with polycythemia vera treated with peg-proline-interferon alpha-2b / Nicole C. C. Them, Klaudia Baginski, Tiina Berg // *American Journal of Hematology*. – 2015. – Vol. 90. – no. 4. – P. 288-294.
7. Novel myelofibrosis treatment strategies: potential partners for combination therapies / B. L. Stein, R. Swords, A. Hochhaus and F. Giles // *Leukemia*. – 2014. vol. 28. – P. 2139-2147.
8. Ojeda-Urbe M. Blood Traffic of Endothelial, Mesenchymal, Hematopoietic and Lin-/CD45-CD34+AC133+CXCR4+ Progenitor Cell Subsets Show Different Patterns in Pre-Fibrotic and Fibrotic Primary Myelofibrosis / M. Ojeda-Urbe, C. Desterke, L. Jung [et al.] // *Blood*. – 2014. – Vol. 124 (21). – P. 3230.
9. Rosenbauer F. & Tenen D. G. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation / Frank Rosenbauer & Daniel G. Tenen // *Nature Reviews Immunology*. – 2007. – V.7. – P. 105-117.
10. Silver R. T. Recombinant interferon- α may retard progression of early primary myelofibrosis: a preliminary report / R. T. Silver, K. Vandris and J. J. Goldman // *Blood*. – 2011. – Vol. 117. – P. 6669-6672.
11. SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival / T. L. Lasho, T. Jimma, C. M. Finke [et al.] // *Blood*. – 2012. vol. 120 (20). – P. 4168-4171.
12. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management / A. Tefferi // *Am. J. Hematol.* – 2011. – № 12. – P. 1018-1026.

УДК: 616.155.194.76+575.191

НОВІ ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПІДХОДИ ДО МОНІТОРИНГУ МІЕЛОФІБРОЗУ

Лозинський Р. Ю., Лозинська М. Р., Гулеюк Н. Л.

Резюме. Розроблено малоінвазивну доступну методику цитогенетичного моніторингу в хворих на мієлофіброз із застосуванням стимулятора гранулопоезу філграстиму. За допомогою цього методу виявлено цитогенетичні аномалії в 38,2% хворих. Спектр аномалій включав: делеції та транслокації 1-ої хромосоми, делеції 5q і 20q, трисомії 3-ої, 8-ої, 9-ої, 12-ої хромосом, моносомії 3-ої, 5-ої, 7-ої, 9-ої, 11-ої, 13-ої, 15-ої, 17-ої хромосом та поліплоїдія. Дані зміни пов'язані з перебігом захворювання та можуть допомогти глибше зрозуміти молекулярну природу розвитку мієлофіброзу, патогенетичних механізмів, які лежать в основі наростання негативної динаміки стану хворих. Значний фіброз кісткового мозку є серйозним обмежувальним чинником для отримання достатньої кількості матеріалу для цитогенетичного аналізу, при цьому запропонований нами підхід дослідження периферійної крові допомагає мінімізувати це обмеження.

Ключові слова: мієлофіброз, Г-КСФ, кариотип.

УДК: 616.155.194.76+575.191

НОВЫЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К МОНИТОРИНГУ МИЕЛОФИБРОЗА

Лозинский Р. Ю., Лозинская М. Р., Гулеюк Н. Л.

Резюме. Разработана малоинвазивная доступная методика цитогенетического мониторинга у больных миелофиброзом с применением стимулятора гранулопоеза филграстима. С помощью этого метода выявлено цитогенетические аномалии в 47% больных. Спектр аномалий включал: делеции и транслокации 1-й хромосомы, делеции 5q и 20q, трисомии 3-й, 8-й, 9-й, 12-й хромосом, моносомии 3-й, 5-й, 7-й, 9-й, 11-й, 13-й, 15-й, 17-й хромосом и полиплоидию. Данные изменения связаны с течением заболевания и могут помочь глубже понять молекулярную природу развития миелофиброза, патогенетических механизмов, лежащих в основе нарастания негативной динамики состояния больных. Значительный фиброз костного мозга является серьезным ограничивающим фактором для получения достаточного количества материала для цитогенетического анализа, при этом предложенный нами подход исследования периферической крови помогает минимизировать это ограничение.

Ключевые слова: миелофиброз, Г-КСФ, кариотип.

UDC: 616.155.194.76+575.191

NEW CYTOGENETIC APPROACHES FOR MYELOFIBROSIS MONITORING

Lozynskyy R., Lozynska M., Huleyuk N.

Abstract. Introduction. Effective monitoring of myelofibrosis requires a combination of different genetic methods: molecular genetic, cytogenetic, immunogenetic. Cytogenetic abnormalities are independent prognostic factors for progression of myelofibrosis. Other important markers of the disease outcome are mutations of genes *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH2*, *TP53* and others. New prognostic systems for myelofibrosis were developed worldwide, such as IPSS and DIPSS Plus that include cytogenetic examinations as important tools to define disease severity and

select appropriate treatment strategy. Only allogenic stem cells transplantation might cure myelofibrosis, but it is often inadmissible for the patients.

Materials and Methods. The study group consisted of 34 patients with myelofibrosis. Hydroxyurea and interferon-alpha were stopped before the sample collection. Peripheral blood of 34 patients was cultivated *in vitro* for 24h with the granulocyte-colony stimulating factor filgrastim, RPMI 1640 and fetal calf serum to increase mitotic activity in the samples.

Results. Minimally invasive technique for cytogenetic monitoring in patients with myelofibrosis was developed using granulocyte stimulator filgrastim. This technique can reduce the need for repeated puncture of the bone marrow, and thus to improve the patient's adherence to diagnostic and therapeutic procedures. Cytogenetic abnormalities were revealed in 13 (38,2%) of patients. The spectrum of abnormalities included aberrations of chromosome 1, deletions of 5q and 20q, trisomies of chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, and polyploidy. Karyotypes of bone marrow and blood were identical in most of the patients. After 12 months of observation new cytogenetic findings were identified, such as monosomies of chromosomes 13 and 15. No mitotic activity was observed at cytogenetic investigation in 4 patients with previous treatment using interferon-alpha not less than 6 months. The pause in the cytostatic drugs usage were not harmful for the clinical outcome in patients studied. High mitotic rate in peripheral blood samples with chromosome abnormalities was connected with higher IPSS rates.

Conclusions. Significant bone marrow fibrosis is a major limiting factor to obtain sufficient material for cytogenetic analysis, and our proposed method of peripheral blood analysis helps to minimize this limitation. Cytogenetic changes are associated with myelofibrosis and may help to better understand the molecular nature of the disease development, pathogenetic mechanisms underlying negative course of myeloproliferative neoplasia in the patients. Our data indicate that specific stimulation of myeloid and megakaryocyte precursors could be an effective diagnostic approach in myeloproliferative neoplasms. New genetic finding might change treatment principles in myelofibrosis.

Keywords: myelofibrosis, G-CSF, karyotype.

Рецензент – проф. Дубінін С. І.
Стаття надійшла 28.10.2015 року