

тирозинкінази (ИТК). Вторичные хромосомные аномалии в Ph-отрицательных клетках обнаружены в 6 случаях, что составило 9% больных с большим цитогенетическим ответом. В дальнейшем у всех этих больных произошла потеря цитогенетического ответа. Таким образом, явление вторичных аномалий в Ph-отрицательных клетках требует более детального изучения, поскольку, согласно нашим результатам, эти аномалии были связаны с худшим прогнозом.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, иматиниб, нилотиниб, кариотип, цитогенетический ответ, вторичные хромосомные аберрации, прогноз.

CYTOGENETIC ABERRATIONS IN Ph-NEGATIVE CELLS OF PATIENTS WITH CML DURING IMATINIB AND NILOTINIB TREATMENT

A.S. Lukyanova

SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine», Lviv

Summary. *Cytogenetic analysis in 104 patients with chronic myeloid leukemia (CML) during tyrosine kinase inhibitors treatment was performed. Secondary cytogenetic abnormalities in Ph-negative cells of were found in 6 cases (9% of patients with major cytogenetic response). Subsequently all these patients lost their cytogenetic response. Therefore, occurrence of secondary cytogenetic changes in Ph-negative cells should be studied more profoundly as according to our results they were associated with adverse prognosis.*

Key words: *chronic myeloid leukemia, imatinib, nilotinib, karyotype, cytogenetic aberration, prognosis.*

Роль вторинних змін кариотипу в перебігу ХМЛ неоднозначна і залишається предметом досліджень та дискусій: деякі аномалії можуть бути тісно пов'язані із розвитком БК ХМЛ, інші можуть мати значення для вивчення механізмів генетичної нестабільності, а не шляхів бластної трансформації. Відомо, що поява вторинних аномалій у Ph-позитивних клітинах є ознакою несприятливого прогнозу та прогресії хвороби. Натомість, з появою інгібіторів тирозинкінази, які селективно елімінують патологічний клон клітин, щораз більше дослідників відмічають появу вторинних хромосомних змін у Ph-негативних клітинах на фоні цитогенетичної відповіді. Значення таких змін повністю не з'ясоване і залишається предметом обговорень.

Метою роботи було вивчення спектру та прогностичного значення вторинних змін кариотипу на фоні цитогенетичної відповіді у хворих на ХМЛ при лікуванні інгібіторами тирозинкінази (ИТК).

Матеріал і методи досліджень. Проведено обстеження 104 хворих на ХМЛ, з них 48 чоловіків та 56 жінок (співвідношення 1:1) віком від 22

до 72 років (середній вік на час обстеження – 44,56 роки). Усі пацієнти знаходились під спостереженням консультативної поліклініки ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», а також за необхідності проходили стаціонарне лікування у гематологічній клініці інституту та 5-ї міської комунальної лікарні м. Львова. Стандартне цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку проводили за загальноприйнятими методиками [1]. Препарати метафазних хромосом аналізували при збільшенні $\times 1000$ під світловим мікроскопом Olympus BX41 (Olympus, Японія) з використанням системи для хромосомного аналізу CytoVision (Applied Imaging, Великобританія). При аналізі та описі каріотипу дотримувались критеріїв *International System for Human Cytogenetic Nomenclature – ISCN, 2009* [9]. Для оцінки цитогенетичної відповіді використовували загальноприйняті критерії [4].

Результати та їх обговорення. Цитогенетичні дослідження проведено у 104 хворих на ХМЛ, які отримували лікування ІТК – іматинібом або нілотинібом. Велику (повну або часткову) цитогенетичну відповідь (ВЦВ) в загальному отримано у 66 (63%) обстежених хворих. Вторинні зміни у Ph-негативних клітинах було виявлено у 6 хворих з ВЦВ (табл. 1).

Таблиця 1

Вторинні хромосомні зміни у хворих на ХМЛ на фоні цитогенетичної відповіді при лікуванні ІТК

№	ІТК	ЦВ та час досягнення від початку лікування (міс)	Тип вторинної зміни	Перебіг хвороби
1	Іматиніб	ПЦВ (24–36)	+8	Втрата ПЦВ
2	Іматиніб	ПЦВ (37)	+8	Втрата ПЦВ; ЧЦВ, +8
3	Іматиніб	ЧЦВ (18–24)	+8	Втрата ЧЦВ; МінЦВ
4	Нілотиніб	ЧЦВ (6)	+8	Втрата ЧЦВ
5	Іматиніб	ЧЦВ (12) ПЦВ (54)	+8, +8 \times 2	Втрата ПЦВ; ЧЦВ, +8
6	Іматиніб	МЦВ (24) ПЦВ (34–40)	del(7q)	Втрата ПЦВ; ЧЦВ, del(7q)

У 5 випадках зміна являла собою додаткову копію хромосоми 8, в 1 випадку – делецію довгого плеча хромосоми 7. В 1 випадку наявність аберації було встановлено на фоні повної цитогенетичної відповіді (ПЦВ), в 2 випадках – на фоні часткової цитогенетичної відповіді (ЧЦВ), в 3

випадках – на фоні ПЦВ та ЧЦВ. У всіх цих пацієнтів при першому дослідженні виявляли Рh-хромосому і відсутність будь-яких додаткових змін у всіх проаналізованих метафазах.

У пацієнтки № 1 цитогенетичні дослідження, проведені після 24 та 36 місяців лікування іматинібом, показали ПЦВ та трисомію 8. В подальшому у хворої відбулась втрата ПЦВ і лікування було змінене на босутиніб.

У пацієнтки № 2 через 37 місяців лікування іматинібом було виявлено ПЦВ та трисомію 8. Після 42 місяців лікування та в подальших 4 дослідженнях стабільно виявляли втрату ПЦВ до ЧЦВ та трисомію 8 у Рh⁺ клітинах.

У хворого № 3 після 18 та 24 місяців лікування виявили ЧЦВ та трисомію 8 у Рh-негативних клітинах. Після 30 місяців лікування контрольне дослідження показало втрату ЧЦВ до мінімальної (МінЦВ) і відсутність Рh-негативних клітин з трисомією 8. Лікування було змінене на нілотиніб, а потім на понатиніб у зв'язку з виявленням мутації Т315І. Внаслідок лікування понатинібом у хворого було виявлено ЧЦВ і відсутність трисомії 8 у Рh-негативних клітинах.

У хворої № 4 після 3 та 6 місяців лікування іматинібом була виявлена мала цитогенетична відповідь (МЦВ), після 12 – МінЦВ. У всіх цих дослідженнях жодних змін у Рh-негативних клітинах не виявляли. Лікування було змінене на нілотиніб і після 6 місяців його прийому було виявлено ЧЦВ та трисомію 8 у Рh-негативних клітинах. Такий каріотип виявляли в декількох наступних дослідженнях, однак в подальшому було встановлено втрату ЧЦВ.

У хворої № 5 через 12 місяців від початку прийому іматинібу контрольне дослідження показало наявність ЧЦВ та наявність трисомії і тетрасомії 8 хромосоми у Рh-негативних клітинах. Аналогічними були результати трьох наступних досліджень. Після 54 місяців лікування вперше було встановлено ПЦВ, однак трисомія 8 зберігалась. В двох інших дослідженнях спостерігали втрату ПЦВ до ЧЦВ, причому в одному з них +8 була наявна, в іншому – відсутня.

У хворого № 6 після 24 місяців лікування іматинібом було виявлено МЦВ і делецію довгого плеча хромосоми 7 у Рh-негативних клітинах. Два наступні дослідження через 34 і 40 місяців показали наявність ПЦВ та наявність del(7q) у Рh-негативних клітинах. Під час останнього дослідження виявлено втрату ПЦВ до ЧЦВ і делецію del(7q) у Рh-негативних клітинах.

Таким чином, в обстеженій групі хворих виявлено 6 випадків появи вторинних цитогенетичних змін в нормальних клітинах на фоні великої цитогенетичної відповіді, що становить 9% від кількості хворих, у яких було отримано ВЦВ (ПЦВ або ЧЦВ). У 5 випадках зміна являла собою

трисомію або тетрасомію 8 хромосоми, в 1 випадку – делецію хромосоми 7. Примітно, що усі хворі з цитогенетичними абераціями у Ph-негативних клітинах через різні проміжки часу втратили цитогенетичну відповідь.

Останнім часом щораз більше авторів виявляють клональну еволюцію у Ph-негативних клітинах, найчастіше описана трисомія 8 [2, 6]. Частота появи аномалій у Ph⁻ клітинах суттєво відрізняється. Найбільше дослідження включало 1001 хворого, серед яких клональні зміни Ph-негативних клітин виявили у 34 випадках (3,4%) [8]. Причиною таких розбіжностей можуть бути невеликі групи обстежених хворих та відносно короткий час спостереження. Крім цього, оскільки детальне каріотипування Ph⁻ метафаз при досягненні цитогенетичної відповіді не завжди проводиться систематично, наведені частоти можуть бути не зовсім точними. Характер аберацій на фоні цитогенетичної відповіді різноманітний. Найчастіше відзначають кількісні зміни (+8, -7, додавання або втрату Y), із структурних – del(7q), del(20q), del(5q), а також збалансовані транслокації. Одні автори не виявляли даних щодо погіршення відповіді на ІТК у хворих з вторинними хромосомними змінами у Ph⁻ клітинах, інші відмічали цитогенетичний рецидив із збереженням гематологічної ремісії [5].

Поки що прогностичне значення та механізми появи клональної еволюції під час цитогенетичної відповіді при лікуванні ІТК невідомі. Запропоновано декілька гіпотез щодо причин цього явища [3, 7]. Перша гіпотеза полягає в тому, що Ph⁻ клони зі змінами могли бути наявні до початку лікування ІТК. Ці клітини спочатку не виявляються в кістковому мозку внаслідок експансії Ph⁺ клону і стають видимими після лікування ІТК, який селективно елімінує *BCR/ABL*-позитивні клітини, не впливаючи на клітини з іншими абераціями. Можна припустити, що Ph⁻ клони з додатковими аномаліями могли бути індуковані попереднім лікуванням. Однак, поки що не виявлено достовірного зв'язку між будь-яким попереднім лікуванням та Ph⁻ клональною еволюцією. З іншої сторони, Ph⁻ клони могли б існувати *ab initio* і представляти основний гемопоетичний дефект або генетичну нестабільність клітин при ХМЛ і випереджати появу лейкоемічних мутацій.

Друга гіпотеза припускає, що Ph⁻ клональна еволюція може бути безпосереднім наслідком впливу ІТК на гемопоетичні клітини, що означає розвиток вторинного МДС. Відомо, що імаїніб має вплив на білки-регулятори росту, які беруть участь в процесах гемопоезу. Оскільки препарат інгібує кіназу ABL, її постійне пригнічення може викликати генетичні пошкодження внаслідок неможливості кінази взаємодіяти з білками, які беруть участь в процесах репарації ДНК. Деякі автори припускають можливість існування обох механізмів появи вторинних змін

на фоні лікування у різних пацієнтів. Моніторинг хромосомних змін і точна локалізація точок розриву, які приймають участь в їх утворенні, можуть поглибити наше розуміння процесів, які лежать в основі патогенетичних механізмів прогресії хвороби.

Висновки

1. В обстеженій групі хворих вторинні цитогенетичні зміни у Ph-негативних клітинах були виявлені у 9% хворих з великою цитогенетичною відповіддю.

2. Вторинні зміни в основному були представлені додатковими копіями хромосоми 8, за винятком одного випадку з делецією хромосоми 7.

3. Спостереження в динаміці показало, що усі пацієнти через різні проміжки часу втратили досягнуту цитогенетичну відповідь і потребували корекції подальшої терапії. Тому появу вторинних змін у Ph-негативних клітинах можна розцінювати як ознаку підвищеного ризику втрати ЦВ.

4. Отримані результати дозволяють рекомендувати проведення цитогенетичного моніторингу (каріотипування) у пацієнтів, які отримують лікування ІТК, незалежно від глибини цитогенетичної відповіді.

Література

1. Андреева, С.В. Стандарты анализа препаратов хромосом при неоплазиях кровотообразования (методичні рекомендації) / С.В. Андреева, В.Д. Дроздова // К., 2007. – 44 с.

2. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome-negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase / E. Jabbour, H.M. Kantarjian, L.V. Abruzzo [et al.] // Blood. – 2007. – V. 110. – P. 2991–2995.

3. Chromosomal abnormalities in Philadelphia (Ph) – negative cells of patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib (STI571) / J. Besalduch, A. Gutierrez, R. Parody [et al.] // Haematologica. – 2007. – V. 88, № 1. – P. 11–12.

4. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet / M. Baccarani, J. Cortes, F. Pane [et al.] // J Clin Oncol. – 2009. – V. 27. – P. 6041–6051.

5. Clinical significance of development of Philadelphia-chromosome negative clones in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate / J.V. Perel, C. McCarthy, O. Walker [et al.] // Haematologica 2005. – V. 90. – P. 70–71.

6. Clonal Ph-negative hematopoiesis in CML after therapy with imatinib mesylate is frequently characterized by trisomy 8 / M.K. Andersen, J. Pedersen-Bjergaard, L. Kjeldsen [et al.] // Leukemia. – 2002. – V. 7. – P. 1390–1393.

7. Próba wyjaśnienia mechanizmu powstawania aberracji typowych dla zespołów mielodysplastycznych w komórkach Ph-ujemnych u chorych z przewlekłą białaczką szpikową (CML) leczonych imatinibem (IM) / B. Mucha, K. Skonieczka, M. Całbecka [i wsp.] // III Polski Kongres Genetyki, 12-15 września 2010: streszczenia. – Lublin, 2010. – P. 106.

8. Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia / C. Terre, V. Eclache, P. Rousselot [et al.] // *Leukemia*. – 2004. – V. 18. – P. 1340–1346.

9. Shaffer L.S. *ISCN 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* / L.S. Shaffer, M.L. Slovak, L.J. Campbell. Basel: S. Karger, 2009. – 138 p.

UDC 591.881:616-092.9:615.37:616.15:616.831-005.484

COMPARATIVE STUDY OF RAT NEURAL CELLS SUPERNATANT AND IMMUNOMODULATORY PREPARATIONS INFLUENCE ON THE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PATIENTS WITH BRAIN GLIOMAS *in vitro*

L. D. Liubich

SI «Acad.A.P.Romodanov Institute of Neurosurgery NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. Objective: *To study the influence of the rat progenitor neurogenic cells supernatant (RPNS) on the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with brain gliomas and to compare it with influence of the preparation with established immunomodulatory properties (halavit).*

Materials and methods. PBMC of patients with brain gliomas (n=20): *anaplastic astrocytomas (III degree of malignancy, n=9) and glioblastomas (IV degree of malignancy, n=11); and persons of comparison group (conditionally healthy individuals without cancer, n=20) were studied. RPNS was received from rat brain tissue on 14th day of gestation. RPNS and halavit («MEDICOR», Russia) in concentration 0.10 mg/ml was added to fresh-isolated PBMC suspensions and incubated for 24 h. Before and after incubation with preparations cell suspensions were analyzed for number of viable cells, apoptotic cells (PI+, CD95+), level of activation antigen expression (CD25+, HLA-DR+).*

Results. *RPNS did not have the cytotoxic effect or had only slightly cytotoxic effect on PBMC of patients with gliomas. Halavit showed significantly more pronounced cytotoxic effect on PBMC of patients with gliomas than RPNS. RPNS as well as halavit showed a tendency to proapoptotic effects on PBMC of patients with gliomas. RPNS as well as halavit did not significantly change the ratio of differential and activation antigens expressed by immunocompetent cells of patients with gliomas.*

Conclusion. *Comparative study showed that RPNS in concentration 0.10 mg/ml has no cytotoxic effect on PBMC of patients with gliomas, unlike immunomodulatory preparation halavit.*

Key words: *peripheral blood mononuclear cells, brain gliomas, progenitor neurogenic cells supernatant, galavit, suspended cell cultures.*