

УДК 616-071:616.155.194.76

Р. Ю. Лозинський

Відділення гематології з лабораторною групою, ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України", Львів

ЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ЛЕЙКОГРАМИ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ КРОВІ ПРИ МІЄЛОФІБРОЗІ

Ключові слова: мієлофіброз, цитогенетичний аналіз, лейкоцитарна формула крові, Г-КСФ.

Резюме. Мієлофіброз є рідкісним практично невиліковним захворюванням із ураженням кровотворних стовбурових клітин. Цитогенетичні аномалії є маркерами несприятливого перебігу хвороби. Для уникнення необхідності пункції фіброзованого кісткового мозку використовується авторська методика цитогенетичного аналізу периферійної крові зі специфічним стимулятором - гранулоцитарним колонієстимулюючим фактором. Метою роботи був пошук критеріїв отримання якісних препаратів метафазних хромосом із периферійної крові для цитогенетичного аналізу в хворих на мієлофіброз. Проаналізовано показники лейкоцитів та рівня мітотичної активності в цитогенетичних препаратах крові 45-ти хворих на мієлофіброз. У 73,3% хворих одержано достатню кількість придатних до цитогенетичного аналізу метафазних пластинок, а у 26,7% - не вдалося отримати мітотичного поділу клітин. Мітотична активність висока в 93,3% хворих із $\geq 1\%$ бластів або промієлоцитів у лейкоцитарній формулі. За наявності зсуву лейкоцитарної формули вліво без цих клітин до мієлоцитів, метамієлоцитів і/або паличкоядерних нейтрофілів $\geq 12\%$ отримано метафазні хромосоми лише в 50% хворих, причому мітотичний індекс виявився нижчим. За відсутності значного лейкоцитарного зсуву вліво достатньої кількості метафазних пластинок не отримано в жодного хворого. Таким чином, цитогенетичне дослідження специфічно стимульованої периферійної крові доцільне за наявності в лейкоцитарній формулі бластних клітин та промієлоцитів, а також має обмежене застосування при значному зсуві лейкоцитарної формули вліво без виявлення цих клітин. При нормальній лейкоцитарній формулі дослідження метафазних хромосом крові недоцільне.

Вступ

Мієлофіброз (МФ) є рідкісним практично невиліковним захворюванням із ураженням кровотворних стовбурових клітин [1]. МФ буває ідіопатичним (первинним) та вторинним, який розвивається внаслідок трансформації справжньої поліцитемії або есенціальної тромбоцитемії [2]. Цитогенетичні аномалії є незалежними прогностичними маркерами несприятливого перебігу МФ. Поява комплексного каріотипу, трисомії 8-ої хромосоми, моносомії 7-ї, 5-ї хромосом, делецій 7q, 5q, 12p, інверсії 3-ої хромосоми, або перебудов у ділянці 11q23, утворення ізохромосоми і(17q) передбачають вищу ймовірність передчасної смерті хворого [3]. Ці хворі з несприятливим перебігом МФ потребують агресивної тактики лікування - проведення аlogenної трансплантації кісткового мозку. На даний час стандартним діагностичним підходом при цьому захворюванні є визначення цитогенетичних аномалій у кіст-

ковому мозку. Однак характерні для МФ значні фіброзні зміни зумовлюють збіднення клітинного складу кісткового мозку, що, своєю чергою, призводить до ускладнень відбору матеріалу для цитогенетичного дослідження метафазних хромосом. Пункції плоских кісток для аспірації кісткового мозку для цього дослідження також є болючими діагностичними процедурами, що негативно впливає на психологічний стан хворих і погіршує їх прихильність до подальших діагностичних та лікувальних процедур. Можливе проведення цитогенетичного аналізу методом флюоресцентної гібридизації клітин периферійної крові (ПК) *in situ*, що дозволяє уникнути зайвих пункцій кісткового мозку. Проте даний підхід є дуже дорогим і трудомістким, оскільки потребує використання специфічних флюоресцентних міток для кожної окремої хромосомної аномалії. Для уникнення цих труднощів була розроблена методика цитогенетичного аналізу ПК з використанням

специфічних стимуляторів замість дослідження аспірату кісткового мозку [4]. Однак у частини хворих не вдалося отримати досить якісних цитогенетичних препаратів ПК для аналізу (через низький мітотичний індекс), тому виникла необхідність провести додаткові діагностичні пункції кісткового мозку. У цій роботі проаналізовано особливості морфології лейкоцитів крові у хворих залежно від мітотичної активності клітин у цитогенетичних препаратах.

Мета дослідження

Пошук критеріїв отримання якісних препаратів метафазних хромосом із периферійної крові для цитогенетичного аналізу у хворих на мієлофіброз.

Матеріал і методи

Усі пацієнти, які проходили обстеження в даному дослідженні, підписали інформовану згоду про участь у ньому. Дослідження було погоджене з локальним етичним комітетом і проводилося згідно з принципами Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних Законів України. Діагноз встановлювався відповідно до критеріїв ВООЗ [5]. Цитогенетичний аналіз метафазних хромосом ПК проводили за авторським методом із використанням гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (Г-КСФ) філграстиму для стимуляції мітотичного поділу циркулюючих стовбурових клітин, бластних клітин та інших незрілих мієлоїдних попередників ПК (заявка на винахід України №а201505498 від 04.06.2015 р.) у 45 пацієнтів (20 осіб чоловічої статі та 25 - жіночої). Культивування клітин *in vitro* здійснювали у всіх випадках протягом 24-х годин. Застосовували культуральне середовище RPMI 1640 та ембріональну телячу сироватку крові. Для зупинки мітозу на стадії метафази використовували розчин колхіцину. Проводили стандартну фіксацію клітин. Застосовували G-метод диференційного забарвлення метафазних хромосом. Мікроскопічні дослідження проводили на світловому мікроскопі при збільшенні 10x100. Аналіз метафазних пластинок проводили з використанням рекомендацій ISCN [6]. Забір крові для цитогенетичного аналізу та цитологічного дослідження лейкоцитарної формули (ЛЕФ) проводився одночасно. Для визначення ЛЕФ використовували мікроскопію мазків ПК, забарвлених за Май-Грюнвальдом. Не менше, ніж за 72 год до проведення дослідження, хворим відміняли цитостатичні препарати. Статистична обробка даних проводилася із використанням критерію Пірсона в програмі OpenOffice Calc.

Обговорення результатів дослідження

У 37 (73,3%) з 45 хворих на МФ, яким проводився цитогенетичний аналіз стимульованої Г-КСФ ПК, була достатня кількість придатних до аналізу метафазних пластинок. Проте у 12 (26,7%) хворих не вдалося отримати мітотичного поділу клітин у препараті та провести цитогенетичний аналіз. Також у більшості хворих, попри можливість цитогенетичного аналізу, частина метафазних пластинок були неналежної якості через наявність хромосомних накладень, які ускладнювали підрахунок хромосом та їх ідентифікацію, особливо за наявності хромосомних аберацій. Дані метафазні пластинки не враховувалися при встановленні каріотипу.

Рівень лейкоцитів значно відрізнявся в різних хворих і залежав від попереднього приймання цитостатичних препаратів (гідроксисечовини та ін.) або стероїдних гормонів. Середній рівень лейкоцитів дорівнював $11,9 \times 10^9/\text{л}$. Максимальний показник становив $54,0 \times 10^9/\text{л}$, мінімальний - $2,3 \times 10^9/\text{л}$. Аналізуючи причини досить значної кількості неінформативних цитогенетичних препаратів ПК, не вдалося виявити зв'язку успішності цитогенетичного дослідження з рівнем лейкоцитів. Достовірних відмінностей рівня лейкоцитів на час обстеження між групами хворих із високим і низьким мітотичним індексом у цитогенетичних препаратах не виявлено ($p=0,065$). Натомість, спостерігалися значні відмінності в кількості виявлених метафазних пластинок у хворих з різними ЛЕФ в ПК. В 14 (93,3%) з 15 хворих, в кого на момент дослідження в ЛЕФ виявлялися промієлоцити й/або бластні клітини, вдалося успішно провести цитогенетичний аналіз препаратів ПК. В 1-ї хворої з наявністю 1% бластів та 3% промієлоцитів у ЛЕФ при першій спробі проведення цитогенетичного аналізу не виявлено мітотичної активності, однак забір матеріалу був проведений повторно з отриманням якісних цитогенетичних препаратів із нормальним каріотипом. Невдача першого аналізу могла бути пов'язана з порушенням хворою підготовки до дослідження (не припинила приймати гідроксисечовину - алкілюючий препарат, який пригнічує поділ клітин).

Із 6-ти хворих, в яких не виявляли в ЛЕФ бластів або промієлоцитів, однак визначалися мієлоцити, лише в 3-х (50%) отримано придатні до аналізу цитогенетичні препарати, однак з нижчим мітотичним індексом, що утруднювало цитогенетичний аналіз. З 17-ти хворих, в яких спостерігався паличкоядерний зсув вліво, вдалося отримати цитогенетичні препарати для аналізу в 13-ти (76,5%), однак при цьому лише в двох хворих одночасно не виявляли інших відхилень у

ЛЕФ. До того ж, за відсутності незрілих гранулоцитарних або еритроїдних попередників у мазку ПК, вдалося отримати мітотичні поділи для цитогенетичного аналізу за наявності лише значного паличкоядерного зсуву вліво в лейкоцитарній формулі (17-25 % паличкоядерних гранулоцитів). Слід зазначити, що мітотичний індекс у цих 2-х випадках був низьким (виявлено до 10 метафазних пластинок). Поясненням наявності мітотичної активності в ПК хворих за відсутності незрілих клітин при підрахунку ЛЕФ може бути збільшення кількості чутливих до Г-КСФ стовбурових клітин, які не можна ідентифікувати цитологічно, та які можуть морфологічно нагадувати лімфоїдні елементи. Зсув ЛЕФ вліво може непрямо вказувати на збільшений вміст стовбурових клітин у ПК. Також не виключена наявність певної незначної кількості бластних клітин (до 0,5%), які могли не виявлятися при цитологічному дослідженні.

При аналізі мазків ПК виявилось, що одержання достатньо якісних цитогенетичних препаратів для успішного каріотипування хворого було можливим лише за наявності значного зсуву вліво в ЛЕФ. Якщо в крові виявляли досить велику кількість незрілих гранулоцитарних і/або еритроїдних клітин-попередників, фіксувалася більша кількість метафазних пластинок, що вказувало на вищий мітотичний індекс.

Висновки

1. Цитогенетичне дослідження стимульованої гранулоцитарним колонієстимулюючим фактором периферійної крові замість кісткового мозку виправдане у всіх хворих на мієлофіброз із наявністю в лейкоцитарній формулі бластних клітин і/або промієлоцитів у кількості не менше 1%.

2. За наявності зсуву лейкоцитарної формули вліво до мієлоцитів/метамієлоцитів і/або при кількості паличкоядерних нейтрофілів не менше 12-ти на 100 лейкоцитів без бластів/промієлоцитів використання для цитогенетичного аналізу крові, стимульованої гранулоцитарним колонієстимулюючим фактором може бути виправданим за неможливості проведення аналізу кісткового мозку.

3. При нормальній лейкоцитарній формулі або незначному паличкоядерному зсуві вліво (до 11%) дослідження метафазних хромосом крові є неефективним, тому в цьому випадку доцільно проводити цитогенетичний аналіз із використанням методу флуоресцентної гібридації *in situ*.

Перспективи подальших досліджень

Буде продовжена робота по вдосконаленню запропонованої неінвазивної методики діагнос-

тики мієлофіброзу.

Література. 1. Epidemiology of Myeloproliferative Neoplasms in Norway / C. Roaldsnes, A. Waage, M. Nurgaard and Waleed Ghanima / Blood. - 2014. - Vol. 124(21). - P. 1858. 2. Passamonti F. A New International Multicenter-Based Model to Predict Survival in Myelofibrosis Secondary to Polycythemia and Thrombocythemia: The Mysec Prognostic Model (MYSEC-PM) / F. Passamonti, A. Vannucchi, D. Caramazza et al. // Blood. - 2014, vol. 124. - P. 1826-1826. 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 [et al.] // Journal of Clinical Oncology. - 2011. - №4. - P. 392-397. 4. Лозинський Р.Ю. Нові цитогенетичні підходи до моніторингу мієлофіброзу / Р.Ю. Лозинський, М.Р. Лозинська, Н.В. Гулеюк // Вісн. пробл біол. і мед. - 2015. - №4 - С.186-191. 5. Kvasnicka H.M. WHO classification of myeloproliferative neoplasms (MPN): A critical update / H.M. Kvasnicka // Curr Hematol Malig Rep. - 2013. - Dec; vol.8(4). - P. 333-341. 6. Shaffer L.G. International System for Human Cytogenetic Nomenclature/ L.G. Shaffer, M.L. Slovak, L.J. Campbell [et al] // Basel: S Karger, 2009.

ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛЕЙКОГРАММЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРОВИ ПРИ МИЕЛОФИБРОЗЕ

Р. Ю. Лозинский

Резюме. Миєлофіброз являється рідким практично незлечимим захворюванням з поразкою кровотворних стоволових кліток. Цитогенетичні аномалії являються маркерами неблагоприятного течення хвороби. Во избежание необходимости пункции фиброзаного костного мозга используется авторская методика цитогенетического анализа периферической крови со специфическим стимулятором - гранулоцитарным колонієстимулюючим фактором. Целью работы был поиск критериев получения качественных препаратов метафазных хромосом с периферической крови для цитогенетического анализа у больных миєлофіброзом. Проанализированы показатели лейкоцитов и уровня митотической активности в цитогенетических препаратах крови 45 больных миєлофіброзом. В 73,3% больных получено достаточное количество пригодных к цитогенетическому анализу метафазных пластинок, а у 26,7% - не удалось получить митотического деления клеток. Митотическая активность была высокой в 93,3% больных с $\geq 1\%$ бластов или промієлоцитов в лейкоцитарной формуле. При наличии сдвига лейкоцитарной формулы влево без этих клеток до миєлоцитов, метамієлоцитов и/или паличкоядерных нейтрофилов $\geq 12\%$ получено метафазные хромосомы только у 50% больных, причем митотический индекс был ниже. При отсутствии значительного лейкоцитарного сдвига влево достаточного количества метафазных пластинок не получено ни у одного больного. Таким образом, ультразвуковое исследование специфически стимулированной периферической крови целесообразно при наличии в лейкоцитарной формуле бластных клеток и промієлоцитов, а также имеет ограниченное применение при значительном сдвиге лейкоцитарной формулы влево без выявления этих клеток. При нормальной лейкоцитарной формуле исследования метафазных хромосом крови нецелесообразно.

Ключевые слова: миєлофіброза, цитогенетический анализ, лейкоцитарная формула крови, Г-КСФ.

SIGNIFICANCE OF LEUKOGRAM VALUES FOR CYTOGENETIC ANALYSIS OF BLOOD IN MYELOFIBROSIS

R. Lozynskyi

Abstract. Myelofibrosis is a rare almost incurable disease with lesions of blood-forming stem cells. Cytogenetic abnormalities are independent prognostic markers of unfavorable disease course in myelofibrosis. The method of cytogenetic analysis of the peripheral blood with specific stimulator - granulocyte colony-stimulating factor is used to avoid the need of puncture of bone marrow with fibrotic changes. The aim of the study was to find the criteria for obtaining high-quality metaphase chromosomes from peripheral blood for cytogenetic analysis in patients with myelofibrosis. Leukocyte features and the level of mitotic activity were analyzed in cytogenetic samples of blood obtained using the author's method for 45 patients with myelofibrosis. In 73.3% of patients a sufficient number of suitable for analyzing metaphase plates were obtained, and in 26.7% mitotic cell division in preparations for cytogenetic analysis were not found. Mitotic activity was high in 93.3% of patients with the presence of 11% blasts or promyelocytes in leukocyte formula. Metaphase chromosomes were obtained only in 50% of patients without these cells, but with the leukocytic shift to the left to myelocytes, metamyelocytes and/or 12% of band neutrophils

(mitotic index was lower complicating the cytogenetic analysis). In the absence of significant left shift of leukocytes the sufficient number of metaphase plates for cytogenetic analysis was not found in any patient. Therefore, the cytogenetic studies of specifically stimulated peripheral blood instead of bone marrow is appropriate in the presence of blast cells and promyelocytes in leukocyte formula, and has limited use in case of major leukocyte shift to the left without these cells. Normal leukocyte morphology in the patient requires the study of metaphase chromosomes of bone marrow or the use of cytogenetic techniques with fluorescent hybridization.

Key words: myelofibrosis, cytogenetic analysis, leukocyte morphology of blood, G-CSF.

State Establishment "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Lviv

Clin. and experim. pathol. - 2016. - Vol. 15, №1 (55). - P. 74-77.

Надійшла до редакції 18.02.2016

Рецензент – проф. І.С. Давиденко

© Р.Ю. Лозинський, 2016