

їх вистилає. Подана цитологічна діагностика цистаденофіброми за асцитичною рідиною під час операції.

**TUMOURS OF OVARY:
CYTOLOGY DIAGNOSTICS OF PERITONEAL
EFFUSION IN CYSTADENOFIBROMA**

*L.S. Bolgova, S.V. Marinenko,
T.M. Tuganova, T.M. Yaroshuk*

Great variability of ovarian tumours of different origin has been reported. Large majority of tumours contain cystic lesions with various types of lining epithelium. Cytologic diagnostics of cystadenofibroma using analysis of peritoneal effusion sampled during surgical treatment is reviewed.

УДК 616-006.446.2-053.2:611-018.1

С.В. Андреева

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА АНОМАЛИЙ
ХРОМОСОМ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ
МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ
В ДИНАМИКЕ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРОМ
BCR-ABL-ТИРОЗИНКИНАЗЫ
У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ**

Государственное учреждение
“Институт гематологии и трансфузиологии
НАМН Украины”, Киев, Украина

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), который является приобретенным заболеванием, возникающим в результате повреждения генома мультипотентной гемопоэтической стволовой клетки, составляет около 14% от всех лейкозов и встречается с частотой 1 случай на 100 000 взрослого населения. ХМЛ — первичное заболевание среднего возраста с пиком проявления в 40–50 лет. Причина возникновения заболевания неизвестна, но у некоторых пациентов в анамнезе зафиксирована химиотерапия и облучение [1,5]. Цитогенетический признак ХМЛ — транслокация t(9;22)(q34;q11), или филадельфийская хромосома (Ph'-хромосома) была описана Nowell и Hungerford в 1960 году [10].

Достижением нецитостатической терапии стало внедрение препаратов целевой терапии, направленных на выборочное уничтожение клеток, несущих t(9;22). Действие препарата “Гливек” (bcr-abl-ингибитор тирозинкиназы) основывается на блокировании АТФ-связывающего участка тирозинкиназы, который отвечает за

фосфорилирование многочисленных эффекторных белков, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла и передачу сигналов в клетке, т.е. препарат обладает генотоксическим действием. В результате этого происходит нарушение функционирования клеток, индуцируется апоптоз аномальных клеток, и появляется возможность к размножению клеток костного мозга (КМ) с нормальным кариотипом. С применением ингибиторов bcr-abl-тирозинкиназы стало возможным наступление не только клинико-гематологической ремиссии, но и достижение и длительное сохранение полной цитогенетической ремиссии. Такие результаты стали возможными и в случаях с вариантными транслокациями или дополнительными аномалиями в клетках КМ при постановке диагноза ХМЛ *de novo* [5, 8].

Для подтверждения генетической ремиссии при использовании ингибитора bcr-abl-тирозинкиназы требуется постоянное проведение цитогенетического и молекулярно-генетического контроля [15]. Разработан стандарт оценки цитогенетического ответа: отсутствие ответа — наличие 96–100% Ph-позитивных метафаз, минимальный — 66–95%, малый — 36–65%, частичный — 1–35%, полный цитогенетический ответ — отсутствие Ph-позитивных метафаз [6]. Достижение цитогенетической ремиссии через 6–12 мес. лечения и молекулярно-генетической ремиссии (1 аномальная клетка на 105 клеток КМ) в течение 12 месяцев рассматривается как золотой стандарт терапии ХМЛ [9].

На протяжении терапии ХМЛ ингибитором bcr-abl-тирозинкиназы “Гливек” первичный клон с t(9;22) может замещаться на клон с другими хромосомными аномалиями. Появление таких аномалий может иметь транзиторный [2] или стабильный характер [11].

Появление дополнительных аномалий хромосом на фоне терапии иматинибом регистрируется в 15,5% случаев. К таким аномалиям относятся трисомии Xp 8, 13, 19, 21, дополнительная t(9;22) [14], сопровождающиеся рефрактерностью к терапии [4,7]. В фазе бластного криза ХМЛ (БК ХМЛ) дополнительные аномалии хромосом могут определять вариант вторичного лейкоза [3].

Целью данного исследования было изучение клональных аномалий хромосом клеток КМ в динамике терапии ингибитором bcr-abl-тирозинкиназы у детей и подростков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ кариотипов в клетках КМ с целью оценки эффективности терапии ингибитором bcr-abl-тирозинкиназы проводили у 34 пациентов (20 девочек и 14 мальчиков) в хронической фазе ХМЛ. Возраст пациентов колебался от 1 года до 18 лет (средний возраст 11,9 лет). В группе пациентов с ХМЛ среднее содержание лейкоцитов составило $175,7 \cdot 10^9/\text{л}$ ($(8,7-800,0) \cdot 10^9/\text{л}$), гемоглобина — $107,4 \text{ г/л}$ ($(55-156) \text{ г/л}$), тромбоцитов — $317,0 \cdot 10^9/\text{л}$ ($(72-1527) \cdot 10^9/\text{л}$), содержание бластных клеток в КМ — $4,9\%$ ($(0-14,0)\%$), бластных клеток в периферической крови (ПК) — $0,9\%$ ($(0-7,0)\%$).

Для цитогенетических исследований препараты метафазных хромосом готовили по общепринятой методике [12] и окрашивали GTG-методом. Хромосомные аномалии описывали согласно ISCN 2009 [13]. Наличие хромосомных аномалий в лейкозном клоне регистрировали по общепринятым правилам, когда две или более метафазных клеток имели идентичные аномалии или дополнительные хромосомы, а также при наличии трех или более метафазных клеток с идентичными моносомиями. Нормальным считали кариотип, когда не менее чем в 20 проанализированных и в десяти кариотипированных метафазных пластинках не было выявлено хромосомных аномалий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было проведено цитогенетическое исследование клеток 34 пациентов, которые получали ингибитор bcr-abl-тирозинкиназы (иматиниб мезилат) в дозе 400 мг/м^2 . Цитогенетический мониторинг не имел систематического обеспечения, периодичность составила один раз в 3 мес., в 6 мес., в 1 год, в 2 года). Количество контрольных исследований эффективности терапии составила от 2 до 8 исследований по каждому из пациентов. В процессе оценки эффективности терапии не зарегистрировано ни одного случая повышения дозы препарата. У всех пациентов после 6 мес. терапии была достигнута клинико-гематологическая ремиссия и только у двоих пациентов зарегистрирована цитогенетическая ремиссия (через 12 и 30 мес. соответственно). У двух пациентов наблюдали прогрессию заболевания на фоне терапии с выходом в фазу акселерации и БК ХМЛ, при этом первичная аномалия $t(9;22)(q34;q11)$ выявлялась в более чем половине метафаз.

Оценить прогностическое значение дополнительных аномалий в первичном клоне с $t(9;22)(q34;q11)$ и/или за пределами этого клона было возможным у лишь 10 пациентов (29,4%) (табл.). Для этого провели сопоставление полученных результатов со следующими показателями: первичный клон, появление дополнительных аномалий по отношению к первичному клону, динамика хромосомных аномалий после появления дополнительных аномалий.

Появление дополнительных аномалий в клоне с первичной аномалией $t(9;22)(q34;q11)$ или за его пределами было выявлено у всех 10 пациентов (№ 1–10). В динамике терапии в 9 случаях (№ 1–5, 7–10) регистрировали дополнительные околотетраплоидные клоны. В одном случае (№ 5) при постановке диагноза и в пяти случаях в динамике терапии (№ 1–3, 7, 8) удалось идентифицировать метафазные хромосомы в околотетраплоидных клонах. Данные метафазные пластинки имели удвоенную первичную аномалию — $t(9;22)$. При этом в случаях № 1, 3, 7 одновременно присутствовали нормальные клоны, что служит явным подтверждением того, что полиплоидизация возникает только в аномальном клоне. Можно предположить, что в случаях цитогенетической ремиссии, при регистрации дополнительного околотетраплоидного клона (№ 4, 9), нельзя исключить наличие нераспознанного аномального клона с удвоенной аномалией.

При постановке диагноза (№ 9) и в динамике терапии (№ 5) один из клонов был гипердиплоидным (57 и 48 хромосом, соответственно). Появление трисомий хромосом на фоне терапии и при постановке диагноза, возможно, является следствием единого механизма адаптации гемопоэтических клеток к химическому воздействию.

В трех случаях (№ 4, 6, 7) на различных этапах терапии в первичном клоне с $t(9;22)(q34;q11)$ появились дополнительные аномалии — потери генетического материала — $del(6)(q23)$, $del(11)(q23)$, $del(16)(q22)$. Все дополнительные клональные аномалии хромосом были зарегистрированы при клинико-гематологической ремиссии. В двух случаях (№ 4, 7) потери материала — $del(11)(q23)$ и $del(6)(q23)$ обнаружены в клонах с первичной аномалией $t(9;22)(q34;q11)$. Делецию $del(16)(q22)$ регистрировали в клоне без первичной аномалии, но в сочетании с $del(11)(q23)$ (№ 9) и $del(21)(q12)$ (№ 6). Несмотря на достижение цитогенетиче-

**Дополнительные аномалии хромосом в клетках костного мозга
при оценке эффективности терапии ингибитором bcr-abl-тирозинкиназы у детей и подростков**

№ п/п	Постановка диагноза	Дополнительные аномалии в динамике терапии	Через 6 мес.	Через 12 мес.	Через 18 мес.
1	Ph[4]/H[30]	Ph[9]/4n±[4]/H[12]	Ph[3]/4n±, Ph×2[2]/H[2]	Ph[25]/4n±, Ph×2[4]/H[2]	Ph[17]/4n±[2]/ H[11]
2	Ph[9]	Ph[28]/3n±, Ph×2[2]	Ph[11]/4n±[7]/ H[5]	Ph[10]	—
3	Ph[[19]	Ph[6]/4n±, Ph×2[2]/H[18]	Ph[17]/4n±[2]	Ph[3]/4n±[22]	—
4	Ph[29]/4n±[7]	Ph,del(11)(q23)[2]/4n±[4]/ H[16]	Ph[2]/4n±[5]/ H[23]	H[14]/4n±[3]	Ph[9]
5	Ph[12]/4n±, Ph×2[2]	Ph[5]/48[2]/4n±[5]/H[23]	—	—	Ph[21]/H[9]
6	Ph[26]/4n±[2]	Ph[6]/del(16)(q22),del(21) (q12)[2]/H[22]	—	—	—
7	Ph[27]/4n±[3]	Ph[21]/Ph,del(6)(q23)[2]/ 4n±, Ph×2[7]/H[19]	Ph[29]/Ph,del(6) (q23)[2]/4n±[5]/ H[14]	Ph[17]/4n±, Ph×2[2]	—
8	Ph[8]/4n±[2]	Ph[17]/4n±, Ph×2[3]	—	—	—
9	Ph[2]/57[2]	del(11)(q23),del(16)(q22) [2]/4n±[4]/H[24]	H[25]/4n±[4]	Ph[7]/del(16) (q22) [2]/H[9]	—
10	Ph,t(15;17) (q22;q11),+der (17q)[cp8]/Ph, t(11;15;17) (p15;q22;q11) [6]/4n±[6]	Ph,t(15;17)(q22;q11,+ der(17q)[5]/H[15]	Ph,t(11;15;17) (p15;q22; q11)[2]/4n± [3]/H[15]	Ph[1]/H[29]	del(16)(q22)[2]/+ 8[cp2]/H[46]

ской ремиссии, во всех случаях отмечено восстановление инициального аномального клона, и в одном случае (№ 4) зафиксирован БК ХМЛ.

Кроме восстановления инициального клона в двух случаях (№ 9, 10) (через 12 и 18 мес., соответственно) выявили дополнительный клон с del(16)(q22), а в случае № 10 — второй независимый клон с трисомией Xp 8.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что присутствие околотетраплоидных клонов в процессе оценки терапии можно рассматривать как неблагоприятный прогностический признак. Появление структурных и количественных аномалий в дополнение к первичной аномалии или за пределами первичного клона, даже при последующем уменьшении размера первичного клона или цитогенетической ремиссии, является неблагоприятным прогностическим признаком. Неоднородность хромосомных аномалий при ХМЛ позволяет понять генетические особенности аномальных клеток при ХМЛ у детей и подростков. Подобные данные будут иметь значение для оценки эффективности проводимого лечения этих больных.

ВЫВОДЫ

1. Среди дополнительных структурных аномалий на фоне терапии ингибитором bcr-abl-тирозинкиназы “Гливек” преобладали делеции по дискам del(16)(q22), del(11)(q23), del(6)(q23), del(21)(q12), среди количественных аномалий — трисомия Xp 8 (по частоте встречаемости).

2. Наличие дополнительных околотетраплоидных клонов при оценке эффективности терапии является неблагоприятным прогностическим признаком.

3. Появление дополнительных структурных и количественных аномалий в клоне с первичной аномалией t(9;22)(q34;q11) или за его пределами при оценке эффективности терапии, даже при последующем уменьшении размера первичного клона или цитогенетической ремиссии является неблагоприятным прогностическим признаком.

ЛИТЕРАТУРА

1. D'Antonio J. Chronic myelogenous leukemia // *Clin. J. Oncol. Nurs.* — 2005. — Vol. 9, № 5. — P. 535–553.
2. de Oliveira F.M., Scrideli C.A., Tone L.G. A case of near-triploid with t(2;14)(p12;q32) in patient with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission //

- Cancer Genet. Cytogenet.* — 2008. — Vol. 186, № 2. — P. 125–126.
3. Fava C., Cortes J. Philadelphia-negative acute myeloid leukemia with new chromosomal abnormalities developing after first-line imatinib treatment for chronic phase chronic myeloid leukemia // *Am. J. Hematol.* — 2008. — Vol. 83, № 9. — P. 755.
 4. GIMEMA Working Party on CML. Chromosome abnormalities additional to the Philadelphia chromosome at the diagnosis of chronic myelogenous leukemia: pathogenetic and prognostic implication / C. Zaccaria, N. Nestoni, A.M. Valentini, S. Luatti, M. Tonnelli, G. Marzocchi, R. Cipriani, C. Baldazzi, B. Giannini, F. Stacchini, C. Gamberini, F. Castagnetti, G. Rosti, A. Azzena, F. Cavazzini, A.M. Cianciulli, A. Dalsass, E. Donti, E. Giugliano, A. Gozzetti, M.G. Grimondi, S. Ronconi, A. Santoro, F. Spedicato, L. Zanatta, M. Baccarani // *Cancer Genet. Cytogenet.* — 2010. — Vol. 199, № 2. — P. 76–80.
 5. Hag A.U. Transformation of Polycythemia vera to Ph⁺-positive myelogenous leukemia // *Am. J. Hematol.* — 1990. — Vol. 33, № 2. — P. 110–113.
 6. Imatinib (ST1571) for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML) / A. Hochhsus, T. Lahaye, S. Kreil, U. Berger, P. Paschka, M.C. Muller, C. Kuhk, A. Weisser, K. Merx, R. Hohmann // *Acute leukemia IX. Basic Research, Experimental Approches and Novel Therapies.* — 2003. — Vol. 42. — P. 109–116.
 7. Influence of additional cytogenetic abnormalities on the response and survival in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib: long-term results / F. Palandri, N. Testoni, S. Luatti, G. Marzocchi, C. Baldazzi, M. Stacchini, F. Castagnetti, M. Breccia, G. Specchia, F. Pane, G. Saglio, G. Martinelli, M. Baccarani, G. Rosti // *Leuk. Lymphoma.* — 2009. — Vol. 50, № 1. — P. 114–118.
 8. Kubota Y., Waki M. Chronic myeloid leukemia with a novel four-way t(6;13;9;22)(p21;q32;q34;q11.2) successfully treated with imatinib mesylate // *Cancer Genet. Cytogenet.* — 2010. — Vol. 201, № 2. — P. 135–136.
 9. Molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate / M.O. Talpaz, S. O'Brein, D. Jones, R. Luthra, J. Shan, F. Giles, S. Faderi, S. Verstovsck, G. Garcia-Manero, M.B. Rios, H. Kantarjian // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11, № 9. — P. 3425–3432.
 10. Nowell P.C., Hungerford D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // *Science.* — 1960. — Vol. 132. — P. 1197.
 11. Reciprocal relationship between a Ph-negative clone with trisomy 8 associated with severe myelodysplasia and a Ph-positive clone following imatinib treatment in a patient with accelerated-phase chronic myelogenous leukemia (CML) / P. Patchenko, A. Klepfish, L. Trakhtenbrot, R. Rothman, E.A. Rachmilewitz // *Am. J. Hematol.* — 2004. — Vol. 77, № 4. — P. 420.
 12. Rooney D.E., Czepulkovsky B.H. *Human Cytogenetics. A practical approach. malignancy and acquired abnormalities.* Second edition. IRL Press at Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo. — 1995. — 293 p.
 13. Shaffer L.G., Tommerup N. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature.* — Karger. — 2009. — 139 p.
 14. Sudden blastic crisis and additional chromosomal abnormalities during chronic myeloid leukemia in the imatinib era / R. Ali, F. Ozkalemkas, V. Ozkocaman, T. Yakut, H.O. Nazilioglu, F. Budak, M. Pekgoz, S. Korkmaz, M. Karkucak, T. Ozcelik, A. Tunali // *Int. J. Clin. Oncol.* — 2009. — Vol. 14, № 6. — P. 545–550.
 15. Zymecnkova A., Al Bahar S., Ramesh P. Trisomy 6 in a CML patient receiving imatinib mesylate therapy // *Leuk. Res.* — 2008. — Vol. 32, № 9. — P.1454–1457.

**ЦИТОГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
АНОМАЛІЙ ХРОМОСОМ ПРИ ХРОНІЧНІЙ
МІЄЛОЇДНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ В ДИНАМИЦІ ТЕРАПІЇ
ІНГІБІТОРОМ ВСR-ABL-ТИРОЗИНКІНАЗИ
У ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ**

С.В. Андреева

Представлено результати цитогенетичного дослідження клітин кісткового мозку в динаміці терапії хронічної мієлоїдної лейкемії інгібітором bcr-abl-тирозинкінази (400 мг/м²) у 34 дітей та підлітків. Поява додаткових аномалій хромосом у клоні з транслокацією t(9;22) або за його межами, а саме: del(16)(q22), del(11)(q23), del(6)(q23), del(21)(q12), трисомія хромосоми 8, додаткові білятетраплоїдні клони свідчать про нечутливість пухлинних клітин до терапії у дітей та підлітків.

**CYTOGENETIC CHARACTERISTIC OF
CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN CHRONIC
MYELOID LEUKEMIA OF DINAMIC THERAPY
WITH BCR-ABL-TYROSINASE INHIBITOR
IN CHILDREN AND ADOLESCENT**

S.V. Andreyeva

Results of cytogenetic investigation of bone marrow cells in dynamic of chronic myeloid leukemia with bcr-abl-tyrosinase inhibitor (400 mg/m²) in 34 children and adolescent were presented. Appearance of additional chromosomal abnormalities such as del(16)(q22), del(11)(q23), del(6)(q23), del(21)(q12), trisomy chromosome 8, additional neartetraploid clones were evidence in tumor cells resistance to therapy in children and adolescent.