

ОСТРЫЙ НЕЛИМФОБЛАСТНЫЙ ЛЕЙКОЗ: ОСОБЕННОСТИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ И ОБУСЛОВЛЕННОЕ ИМИ КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

А.М. Вакульчук¹, Н.Н. Третьак¹, С.Е. Калинина², А.И. Коваль¹, Т.П. Перехрестенко¹

¹Государственное учреждение «Институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины», Киев;

²Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, Киев

У 106 больных острым нелимфобластным лейкозом (ОНЛЛ) проведен анализ цитогенетических изменений клеток костного мозга и клинического течения заболевания. С учетом выявленных реаранжировок хромосом пациенты распределены на три группы. В первую группу вошли больные, имеющие аномалии кариотипа, типичные для определенных вариантов ОНЛЛ. Вторая группа объединяла больных с редкой патологией хромосом, которая не ассоциируется с каким-либо вариантом заболевания. Третью группу составили больные с уникальными реаранжировками хромосом, имеющими особенный механизм образования кариотипических изменений. В эту группу вошли 3 пациента, у которых определялись сложные аномалии кариотипа: первый больной 46, XY, t(2;15)(q37;p13), +12, add(13)(q14), add(13)(21), вторая больная 42, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -8, -15, i(17q), -18, +mar/ 44, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q), -18, ++mar[2]/ 44, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q), -18, +mar, +min/ 46, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), del(8)(q21), -15, i(17q), -18, +mar[4]/44, XX, -3, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q), -18, +mar, +min, третий больной 51, XY, t(12;18)(p13;p11.3), +8, +10, -14, der17, +mar[5]. Особенности реаранжировок t(2;15)(q37;p13), t(6;17)(p25;q25), t(12;18) состояли в том, что они стали впервые выявленными транслокациями между этими хромосомами, а также то, что в образовании этих транслокаций принимали участие целые хромосомы, а не их фрагменты.

Ключевые слова: острый лейкоз, цитогенетика, кариотип, аномалии хромосом

ACUTE NON-LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: CHARACTERISTICS OF CYTOGENETIC ANOMALIES AND THEIR INFLUENCE ON CLINICAL COURSE OF THE DISEASE

A.M. Vakulchuk¹, N.N. Tretyak¹, S.Ye. Kalinina², A.I. Koval¹, T.P. Perekhrestenko¹

¹State Enterprise «Institute of hematology and transfusiology of AMN of Ukraine», Kiev; ²A.A. Bohomoltz National Medical University, Kiev

Cytogenetic changes in bone marrow cells and their influence on clinical course of the disease were analyzed in 106 patients with acute non-lymphoblastic leukemia (ANLL). According to rearrangements of chromosomes the patients were divided into three groups. The first group consisted of patients with anomalies of karyotype typical for particular variants of ANLL. The second group comprised patients with chromosome anomalies, which are not associated with any special variant of disease. The third group included patients with unique rearrangements of chromosomes characterized by special mechanism of formation of karyotype changes. Overall, three patients with complex karyotype anomalies formed the third group: first patient with 46, Y, t(2;15)(q37;p13), +12, add(13)(q14), add(13)(21), second patient with 42, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -8, -15, i(17q), -18, +mar/ 44, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q), -18, ++mar[2]/ 44, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q), -18, +mar, +min/ 46, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), del(8)(q21), -15, i(17q), -18, +mar[4]/44, XX, -3, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q), -18, +mar, +min, and third patient with 51, XY, t(12;18)(p13;p11.3), +8, +10, -14, der17, +mar[5]. Among peculiar features of - t(2;15)(q37;p13), t(6;17)(p25;q25), t(12;18) rearrangements were the primary character of translocations between these chromosomes, and participation of whole chromosomes, but not their fragments, in the formation of translocations.

Key words: acute leukemia, cytogenetic, karyotyping, chromosome anomalies

В группу острых нелимфобластных лейкозов (ОНЛЛ) входят лейкозы, возникшие из клеток предшественников миелоидного или моноцитарного ростков кроветворения [1]. Лейкозы, родоначальниками которых являются клетки эритроцитарной и мегакариоцитарной природы, также относятся к этой категории гемобластозов. Критерии ФАБ классификации 1991 г., основанные на морфологических и цитохимических данных бластных клеток, остаются основополагающими для верификации различных вариантов ОНЛЛ [2]. Однако развитие лейкологии, а также потребности практической гематологии обусловили необходимость введения дополнительных маркеров для более пол-

ной биологической характеристики лейкоемического процесса. Использование фундаментальных методов исследования, в первую очередь генетических, позволило глубже проникнуть в патогенетические основы развития гемобластозов. Идентификация хромосомных аномалий в значительной степени способствовала пониманию морфологической вариабельности бластных клеток и клинической гетерогенности ОНЛЛ. Было установлено, что именно характер мутаций в значительной степени определяет морфологию опухолевых клеток, уровень их злокачественности и чувствительность к проводимой полихимиотерапии [3]. В настоящее время перечень известных аномалий хромосом

у больных ОНЛЛ насчитывает более 5000 различных реаранжировок, при этом количество их продолжает дополняться [4]. Соответственно рекомендациям ВОЗ данные генетических исследований стали важной составляющей комплексного обследования больных ОНЛЛ [5]. Верификация изменений хромосом является необходимой для уточнения диагноза, прогнозирования течения заболевания, выбора тактики лечения и контроля его эффективности [6]. На основании сравнительного анализа выяснилось, что для некоторых аномалий хромосом характерен свой географический ареал преимущественного распространения [4]. Отмечена также различная частота выявления определенных реаранжировок хромосом в группах больных, отличающихся по возрасту [7]. Все это указывает на неоднородность результатов кариотипического анализа в различных исследуемых группах больных ОНЛЛ, а также необходимость продолжить накопление материала, отображающего разнообразие цитогенетических нарушений.

Материалы и методы

На протяжении 2000—2005 гг. обследовано 106 больных с первичным ОНЛЛ (54 женщины и 52 мужчины) в возрастной категории от 20 до 70 лет (медиана 65 лет). Для установления диагноза и верификации типа ОНЛЛ использовались критерии ФАБ-классификации. Материалом для проведения исследований были периферическая кровь (ПК) и костный мозг (КМ) больных ОНЛЛ (пунктат и трепанобиопсия гребня подвздошной кости).

В динамике наблюдения за пациентами учитывались данные анамнеза, оценивались клинические симптомы и синдромы, проводились цитохимическое и кариотипическое исследования клеток КМ.

Цитохимическое исследование клеток КМ и ПК проводилось в отделении цитохимии и имму-

нологии Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины.

Анализ хромосом осуществлялся в отделении заболеваний системы крови Государственного учреждения «Институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины» в соответствии с модифицированными методиками цитогенетических исследований, предложенных Ram S. Verma et Arvind Babu [8]. Препараты хромосом в метафазе получали в результате культивирования клеток КМ в течении 24—48 ч при температуре 37°C без применения фитогемагглютинина. Для этого использовали питательную среду RPMI-1640, эмбриональную телячью сыворотку, антибиотики. Клеточный цикл на стадии митоза останавливался раствором колхицина в концентрации 0,05 мг/мл. Культура клеток обрабатывалась 0,56% раствором хлорида калия при температуре 37°C. Фиксацию клеток проводили раствором метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Дифференциальную окраску хромосом на G-диски проводили с помощью 0,25% раствора трипсина и 2% раствора красителя Гимза. Идентификацию выявленных реаранжировок проводили с помощью компьютерной системы «Метаскан-2» (Украина), а их интерпретацию осуществляли в соответствии с Международной системой номенклатуры дифференциально сегментированных хромосом человека (ISCN) [9].

Результаты исследования и их обсуждение

Клиническая картина наблюдаемых больных ОНЛЛ свидетельствовала о несомненном ОНЛЛ, клиническими проявлениями которого были анемический, геморрагический и интоксикационный синдромы. У части больных значительное влияние на течение заболевания оказывала сопутствующая патология, которая часто обострялась на фоне основного заболевания.

Цитогенетическое исследование больным проводили до назначения полихимиотерапии (ПХТ). Метафазные пластинки, которые соответствовали требованиям ISCN, получены у 60 пациентов. Патология хромосом выявлена в 35 (58%) случаях, нормальный кариотип определялся у 35 (42%) больных. Выявленные реаранжировки хромосом распределили на три группы:

- типичные аномалии кариотипа, характерные для определенных вариантов ОНЛЛ;
- редкие аномалии хромосом, которые не ассоциируются с определенными вариантами заболевания;
- реаранжировки хромосом, имеющие особенный меха-

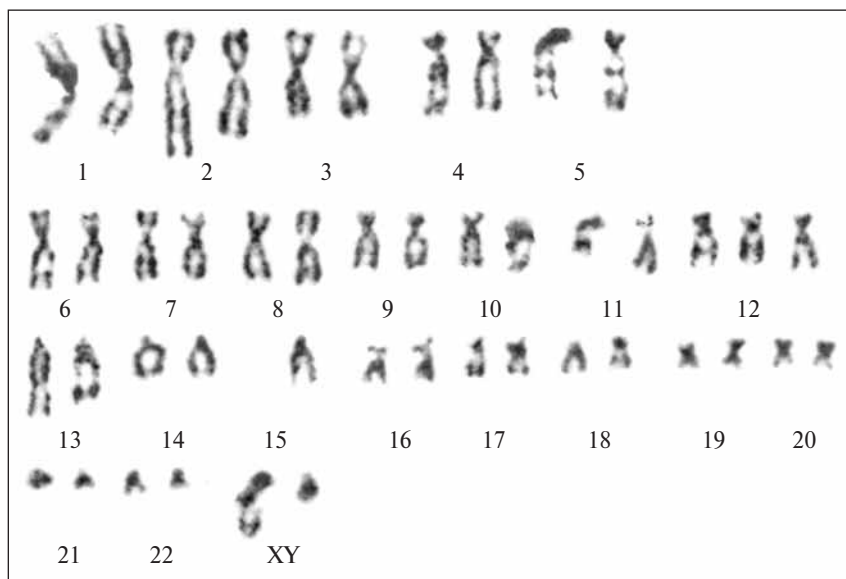


Рис. 1. Больной М., диагноз ОНЛЛ М5. Кариотип: 46, XY, t(2;15)(q37;p13), +12, add(13)(q14), add(13)(21)

низм образования кариотипических изменений и ранее не описанные.

Клиническое течение ОНЛЛ, а также особенности аномалий кариотипа больных 3-й группы представляют фактическую основу данной статьи.

Больной М., 45 лет. Во время госпитализации состояние больного оценивалось как тяжелое в связи с выраженным геморрагическим и интоксикационным синдромом. Объективно определялось увеличение печени на 3 см и селезенки на 4 см ниже реберной дуги. Общий клинический анализ крови от 22.04.2003: гемоглобин (Hb) — 92 г/л, эритроциты — $2,4 \times 10^{12}$ /л, цветной показатель — 0,88, лейкоциты — $24,5 \times 10^9$, бластные клетки — 15%, сегментоядерные нейтрофилы — 9%, лимфоциты — 23%, моноциты — 52%, эозинофилы — 1%, тромбоциты — $41,8 \times 10^9$ /л. СОЭ — 30 мм/ч. В гиперклеточном КМ определялись: бластные клетки — 58%, миелоциты (мц) — 1%, метамиелоциты — 3%, палочкоядерные нейтрофилы — 1%, сегментоядерные нейтрофилы — 8%, эозинофилы — 2%, лимфоциты — 6%, моноциты — 8%, нормоциты: базофильные — 7%, полихроматофильные — 4%, оксипильные — 2%.

На основании цитохимического исследования ПК и КМ установлен диагноз ОНЛЛ М5 согласно критериям ФАБ-классификации. При цитогенетическом исследовании клеток КМ выявлен патологический клон 46, XY, t(2;15)(q37;p13),+12, add(13)(q14), add(13)(21), представленный на рис. 1.

В перечне известных аномалий кариотипа больных ОНЛЛ данные относительно участия 2-й и 15-й хромосомы в транслокации t(2;15)(q37;p13) отсутствуют [4]. Поэтому транслокацию t(2;15)(q37;p13) можно считать ранее не описанной реаранжировкой хромосом. Установлено, что в локусе 13q14 находятся гены-супрессоры злокачественного роста [10]. С учетом этого у больного М. установлено одновременное вовлечение в патологический процесс аллельных генов-супрессоров, расположенных на 13-й хромосоме.

Во время проведения первого курса ПХТ по схеме «7+3» усилился геморрагический синдром, что привело к смерти больного.

Больная С., 62 года. Начало заболевания манифестировало гипертермией, язвенно-некротическим поражением полости рта, двусторонней пневмонией. Общий клинический анализ крови от 21.05.2002: Hb — 51 г/л,

эритроциты — $2,2 \times 10^{12}$ /л, цветной показатель — 0,8, лейкоциты — 40%, бластные клетки — 14%, мц — 16%, метамиелоциты — 20%, палочкоядерные нейтрофилы — 14%, сегментоядерные нейтрофилы — 18%, лимфоциты — 13%, моноциты — 5%, тромбоциты — 30×10^9 /л, СОЭ — 60 мм/ч. При исследовании КМ определялись: бластные клетки — 43%, мц — 2%, метамиелоциты — 8%, палочкоядерные нейтрофилы — 3%, сегментоядерные нейтрофилы — 9%, лимфоциты — 7%, моноциты — 8%, нормоциты: базофильные — 4%, полихроматофильные — 9%, оксипильные — 5%.

На основании цитохимического исследования ПК и КМ установлен диагноз ОНЛЛ М4 согласно ФАБ-классификации.

При цитогенетическом исследовании определялось несколько патологических клонов: 42, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -8, -15, i(17q),-18, +mar/ 44, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q),-18, ++mar[2]/ 44, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q),-18, +mar, +min/ 46, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), del(8)(q21), -15, i(17q), -18, +mar[4]/44, XX, -3, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q),-18,+ mar, + min. На рис. 2 представлена метафазная пластинка с кариотипом: 46, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q), -18, +mar[2].

Данных, описывающих транслокацию t(6;17)(p25;q25) у больных ОНЛЛ, в доступной научной литературе не найдено, поэтому такую аномалию следует считать впервые установленной.

Проводимое лечение по схеме ПХТ «7+3» не привело к улучшению состояния. После первого курса терапии количество бластов в ПК уменьшилось незначительно, наблюдалось нарастание язвенно-некротических поражений и геморрагического синдрома, вследствие которых больная умерла.

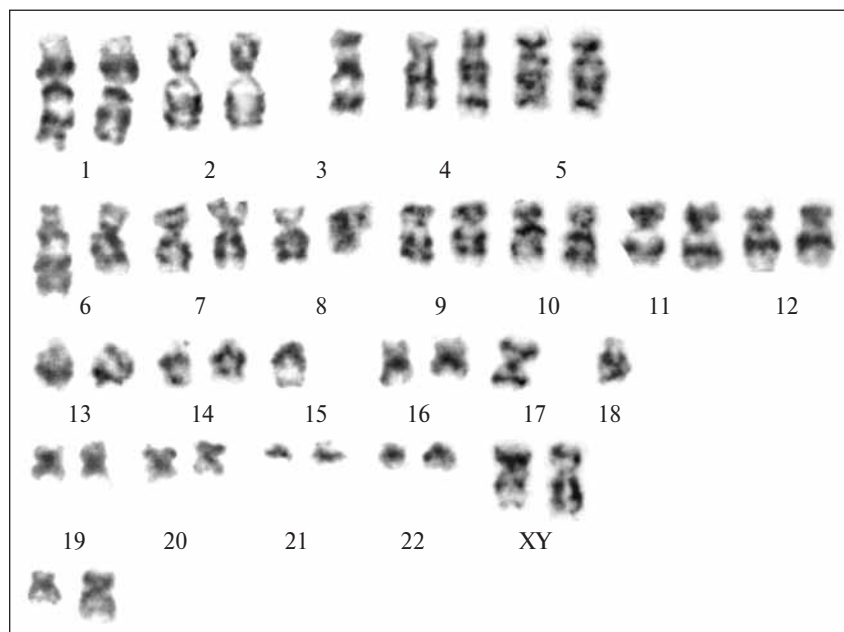


Рис. 2. Больная С., диагноз ОНЛЛ М4. Кариотип: 46, XX, -4, t(6;17)(p25;q25), -15, i(17q), -18, +mar[2]

Больной Т., 58 лет. Заболевание протекало агрессивно с проявлениями гипертермии, выраженного геморрагического синдрома, увеличением печени до 3 см и увеличения селезенки до 4 см ниже реберной дуги. Общий клинический анализ крови от 2.05.2004: Нб — 47 г/л, эритроциты — $1,6 \times 10^{12}/л$, цветной показатель — 0,9, лейкоциты — $2,3 \times 10^9$, бластные клетки — 38%, тромбоциты — $27 \times 10^9/л$. СОЭ — 60 мм/ч. Исследование КМ : бластные

клетки — 86%, мц — 2%, сегментоядерные нейтрофилы — 4%, лимфоциты — 1%, моноциты — 1%, нормоциты: базофильные — 1%, полихроматофильные — 5%.

На основании цитохимического исследования ПК и КМ установлен диагноз ОНЛЛ М4 согласно критериям ФАБ-классификации.

Кариотипический анализ выявил связанные между собой патологические клоны: 51, XY,

$t(12;18)(p13;p11.3)$, +8, +10, -15, +mar[5]/50, XY, $t(12;18)(p13;p11.3)$, +8, +10, -15, +mar[3], +min/50, XY, $t(12;18)(p13;p11.3)$, +8, +10, -15, +mar[4]. На рис. 3 представлена метафазная пластинка с кариотипом: 51, XY, $t(12;18)(p13;p11.3)$, +8, +10, -15, der17, +mar[5].

В доступной научной литературе данных относительно $t(12;18)(p13;p11.3)$ не найдено [2]. С учетом этого $t(12;18)(p13;p11.3)$ следует считать ранее не описанной реаранжировкой хромосом у больных с ОНЛЛ.

Состояние больной после проведения ПХТ по схеме «7+3» прогрессивно ухудшалось. В связи с низкой чувствительностью бластных клеток к ПХТ количество бластов в ПК не уменьшилось. Вследствие прогрессирования патологического процесса больной умер.

Таким образом, описанные выше аномалии хромосом больных ОНЛЛ объединяют несколько общих признаков.

1. Выявленные реаранжировки хромосом имеют множественные аномалии кариотипа, что может указывать на возможность наличия в прошлом миелодиспластического синдрома, который не был диагностирован.

2. Отдельные составляющие выявленных кариотипических изменений всех трех больных, а именно $t(6;17)(p25;q25)$, $t(12;18)(p13;p11.3)$, $t(2;15)(p13;p11.3)$, относятся к ранее не описанным реаранжировкам хромосом.

3. В идентифицированных транслокациях $t(6;17)(p25;q25)$, $t(12;18)(p13;p11.3)$, $t(2;15)(p13;p11.3)$ принимают участие целые хромосомы.



Рис. 3. Больной Т. Диагноз ОНЛЛ М4. Кариотип: 51, XY, $t(12;18)(p13;p11.3)$, +8, +10, -15, der17, +mar[5]

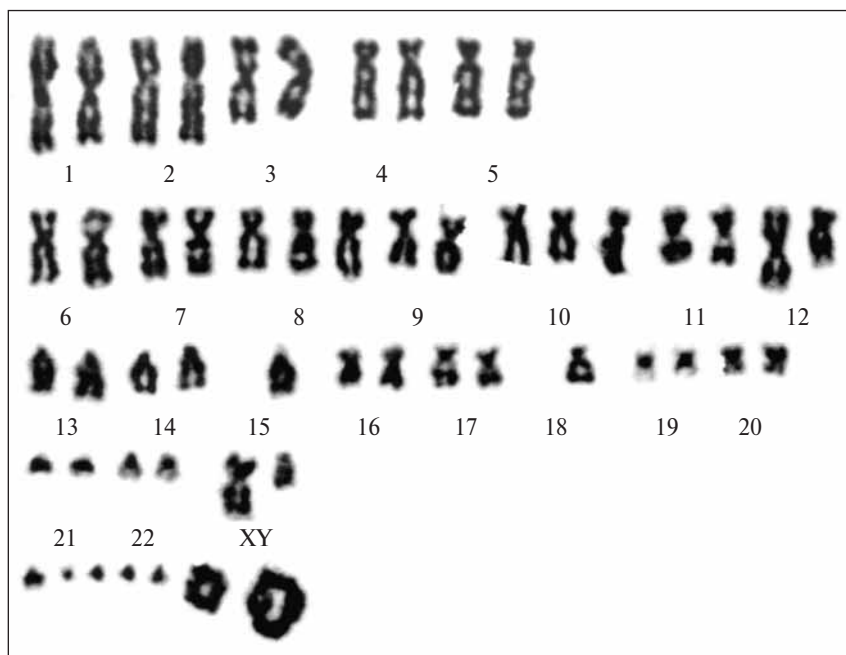


Рис. 4. Кариотип 53, XY, $t(12;18)(p13;p11.3)$, +8, +10, -14, der17, +r[2], +mar[5]

Образование этих реаранжировок является главной особенностью выявленных хромосомных аномалий. Как известно, транслокации хромосом разделяются на сбалансированные, в результате которых не происходит потеря генетического материала, а также несбалансированные, приводящие к потере фрагментов хромосом. В каждом из этих случаев в транслокацию вступают фрагменты двух задействованных в перестройке хромосом [11]. В образовании t(6;17)(p25;q25), t(12;18)(p13;p11.3), t(2;15)(p13;p11.3) принимают участие целые хромосомы, поэтому этот механизм аналогичен образованию дицентриков и кольцевых хромосом. Как правило, такие реаранжировки являются следствием делеций конечных отделов хромосом и последующим их соединением [12].

Дополнительным доказательством такого механизма образования транслокаций служит наличие кольцевых хромосом, которые также являются результатом соединения концевых делеций одной хромосомы, у больного Т. (рис. 4).

К особенностям выявленных реаранжировок у всех трех больных следует отнести обнаружение общих неслучайных цитогенетических изменений, которые играют определенную роль в патогенезе ОНЛЛ. Обращает на себя внимание участие 15-й хромосомы в образовании различных аномальных кариотипов. Дважды выявлена моносомия 15-й хромосомы, в одном случае данная хромосома принимала участие в транслокации. Окончательная роль всех расположенных на 15-й хромосоме генов в становлении ОНЛЛ не установлена. Однако предполагается, что локализованный в локусе 15q22 ген промиелоцитарного лейкоза может играть существенную роль в возникновении как острой промиелоцитарной лейкемии, так и других лейкозов. Доказательством этого служит улучшение результатов лечения больных

с различными вариантами ОНЛЛ в результате применения препаратов трансретиноевой кислоты [13].

Таким образом, определяемые нами особенности цитогенетических изменений у больных ОНЛЛ, основывающиеся на качественных характеристиках выявленной патологии хромосом. Частота таких аномалий кариотипа может достигать 8%, что указывает на необходимость продолжить наблюдения за пациентами, имеющими аналогичные реаранжировки хромосом [14].

Согласно общепринятым критериям больные ОНЛЛ с наличием сложных изменений хромосом относятся к группе неблагоприятного прогноза [15]. Выявленные в описанных случаях комплексные аномалии кариотипа обусловили тяжелое течение заболевания и низкую чувствительность бластных клеток к проводимой терапии. Достигнуть улучшения клинко-гематологических показателей после проведения стандартной терапии по схеме «7+3» не удалось ни в одном из случаев. Длительность течения заболевания у пациентов не превышала 2 мес. Смерть больных наступала от прогрессирования основного заболевания и развития различных осложнений.

Безусловно, одна из основных проблем, которая сейчас не позволяет решить вопрос патогенетического влияния изменений хромосом на геном клетки в процессе малигнизации, заключается в значительном количестве различных реаранжировок [4]. Необходим поиск и выделение кариотипических изменений, имеющих определяющее влияние на образование патологического клона. С учетом успехов в лечении ОНЛЛ становится очевидным, что изучение генетических механизмов онкогенеза с целью их дальнейшей коррекции является перспективным направлением в борьбе с этим тяжелым заболеванием.

Л и т е р а т у р а

1. Третьяк Н. М. Гематология. Учебное издание. Киев, Внешняя торговля; 2005. с. 240.
2. Bennett J. M., Catovsky D., Daniel M.-T., Flandrin G., Galton D. A. G., Gralnick H. R., Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* 1991;78:325.
3. Сергеев А.Г., Иванов Р.А., Фечина Л.Г. Диагностическое и прогностическое значение генетических аномалий опухолевых клеток при лейкозах. *Гематол и трансфузиол* 2000;45(1):28—35.
4. Mitelman F. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer/ Eds. Johansson B., Mertens F. John Wiley and Sons, Inc. 1998.
5. Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J. The World Health Organization Classification of Neoplasms of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting — Airlie House, Virginia, November 1997. *J. Hematology* 2000;1:53—66.
6. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. Руководство для врачей. М., Медицина; 2001.
7. Флейшман Е.В., Соколова О.И., Попа А.И. и др. Возрастные особенности цитогенетических изменений при острых миелоидных лейкозах. *Онкогематол* 2007;4:12—17.
8. Ram S. Verma, Arvind Babu. Human chromosomes: principles and techniques. 1995. p. 411.
9. ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetics. Nomenclature. Ed by Mitelman F.; 1994.
10. Coignet L.J., Lima C.S., Min T. et al. Myeloid- and lymphoid-specific breakpoint cluster region in chromosome band 13q14 in acute leukemia. *Genes Chromosom Cancer* 1999;25:222—9.
11. Олышанская Ю.В., Домрачева Е.В. Хромосомные перестройки при острых лейкозах. М., МЕДпресс-информ 2006; с. 112.
12. Gisselsson D., Hgglund M., Mertens F. et al. The structure and dynamics of ring chromosomes in human neoplastic and non-neoplastic cells. *Hum Genet* 1999;104:315—25.
13. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н. Лечение острых лейкозов. М., МЕДпресс-информ 2004; с. 224.
14. Вакульчук А.М., Третьяк Н.Н., Калинина С.Е. и др. Зависимость клинической картины и чувствительности к химиотерапии больных МДС и ОНЛЛ от изменений кариотипа. *Вестн гематол* 2007;111(2):10.
15. Mrozek K., Heinon K., Bloomfield C.D. Prognostic Value of Cytogenetic Finding in Adults With Acute Myeloid Leukemia. *Inter. J. Haematol.* 2000;72:261—71.