

ОНКОЛОГИЯ

УДК 616-006.441-018-071-036.8

*А. Н. Богданов, В. О. Саржевский, С. Н. Колюбаева,
Н. А. Викторова, А. В. Киссель, О. Р. Краснова, А. А. Титова*

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОМ

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Лимфомы составляют более 2 % от общего числа злокачественных опухолей. Однако с каждым годом число этих заболеваний увеличивается в геометрической прогрессии, гораздо в большей пропорции, чем меланома или рак легкого у женщин. Возникновение данных опухолей обусловлено генетической предрасположенностью, иммунным статусом и вирусными инфекциями.

Лимфомы представляют собой группу злокачественных опухолей, которые являются результатом неопластической пролиферации лимфоидных клеток. Несмотря на общее происхождение из лимфоидных клеток, лимфомы — это чрезвычайно гетерогенная группа малигнизированных опухолей. Гетерогенность их обусловлена большим количеством гистологических субтипов, нодальным или экстранодальным происхождением, а также способностью диссеминировать в организме. Кроме того, имеет значение возраст больного и наличие у него сопутствующих заболеваний. Исходя только из гистологических типов, невозможно предсказать течение заболевания у каждого пациента [1].

В связи с этим предлагаются различные прогностические факторы для оценки качества лечения. Так, один из вариантов — система стадирования Ann Arbor [2]. Внедрение более интенсивных режимов химиотерапии привело к использованию прогностических индексов, которые включают ряд параметров. Общие усилия определили формулирование международного прогностического индекса [2]. В этот суммарный термин входят и цитогенетические показатели. Что касается диагностики лимфом, то в большинстве случаев она не представляет трудностей. Однако при дифференциальной диагностике между некоторыми формами лимфом требуются дополнительные сведения, которые можно получить при цитогенетическом анализе [3].

В настоящее время установлено, что около 90 % всех лимфом имеет цитогенетические повреждения [4, 5]. При этом каждой группе соответствуют свои хромосомные нарушения. Сложность кариотипа становится важным прогностическим фактором. Чем больше маркерных хромосом, тем хуже прогноз. Однако существуют и отдельные независимые маркеры плохого прогноза при лимфомах. Это — del 13q, +2, dmin, разрывы в участке 1q21–22, 6q23–25, а также численные и структурные изменения 17-й хромосомы.

© А. Н. Богданов, В. О. Саржевский, С. Н. Колюбаева и др., 2008

Неходжкинские лимфомы, как и лимфомы Ходжкина, имеют, хотя и менее выраженное, географическое распределение и социально-экономический статус [6]. Примером этому может служить распределение фолликулярных лимфом с транслокацией между 14-й и 18-й хромосомами. Так, в США число этих заболеваний составляет около 90 %, в Швеции — 75, в Германии — 55 и в Японии не превышает 25 % [6].

Лимфомы обладают выраженной способностью к диссеминации. В настоящее время установлено, что по крайней мере в 75 % случаев фолликулярных лимфом имеет место диссеминация в периферическую кровь [6, 7].

Костный мозг, как было показано, является информативным только на терминальной стадии заболевания, а лимфоузлы могут быть использованы только при экстирпации, что резко ограничивает количество повторных исследований, выполнение которых необходимо в процессе лечения. В связи с этим периферическую кровь, которая была использована в качестве материала для настоящего исследования, подвергали стимуляции митогенами, специфичными для Т- или В-клеточных линий: ФГА, поуквид или интерлейкин-2.

Материалы и методы исследования. Цитогенетическое исследование проводили у 89 больных (32 женщины и 57 мужчин) с различными формами лимфом, которые находились на лечении в клинике факультетской терапии ВМА, при этом цитогенетическое исследование было проведено в 107 случаях (у ряда пациентов параллельно исследовали костный мозг и периферическую кровь). Средний возраст женщин составил 50 лет, мужчин — 49 лет.

В качестве материала служил костный мозг, полученный у пациентов во время стеральной пункции в пробирку со средой RPMI-1640, и периферическая кровь, взятая при венопункции в пробирку с гепарином.

Клетки костного мозга культивировали в среде RPMI-1640 («Sigma», США) с добавлением 20 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (ППС) и 0,004 мкг/мл колхицина («Merck», Германия) в течение 24 ч. Периферическую кровь в количестве 1 мл добавляли в пробирку с ППС и культивировали в течение 72 ч при температуре 37 °С в случае использования в качестве митогена ФГА («Sigma», США) и в течение 3–5 дней в случае использования интерлейкина-2 (ИЛ) («Sigma», США) или поуквида («Sigma», США). За 2–3 ч до фиксации добавляли колхицин. Фиксацию метанол-уксусной кислотой осуществляли по общепринятой методике. Ресуспензированный в фиксаторе осадок раскапывали на влажные стекла и помещали на 24–48 ч в термостат ($t=60^{\circ}\text{C}$), затем обрабатывали трипсином с последующей окраской по Гимзе. Препараты анализировали с учетом международной классификации хромосом [8]. В качестве клона рассматривали 2–3 клетки с идентичными повреждениями; в случае моносомии, т. е. при отсутствии одной и той же хромосомы, таких клеток должно быть не менее трех. При этом количество анализируемых клеток зависело от количества выявленных клональных клеток и составляло от 20 до 300.

Полученные данные обработаны математически с применением пакета статистических программ «Statistica 6.0».

Результаты и их обсуждение. Анализ данных у 89 пациентов не выявил корреляции между стадией заболевания и количеством клональных клеток в периферической крови. По-видимому, количество опухолевых клеток зависит только от степени диссеминации опухоли, т. е. является ее специфической особенностью.

Как следует из рис. 1, численные клональные изменения в кариотипе лимфом наблюдаются для 3, 11, 14, 17, 18-й, X, Y и маркерных хромосом, которые составили приблизительно 1/3 от общего количества клональных повреждений, выявленных при анализе. При этом наиболее часто встречается трисомия по 3, 18 и X (не более 5 %) и маркерным хромосомам (9 %). Клональная моносомия 8-й, 22-й, X, а также отсутствие Y хромосомы

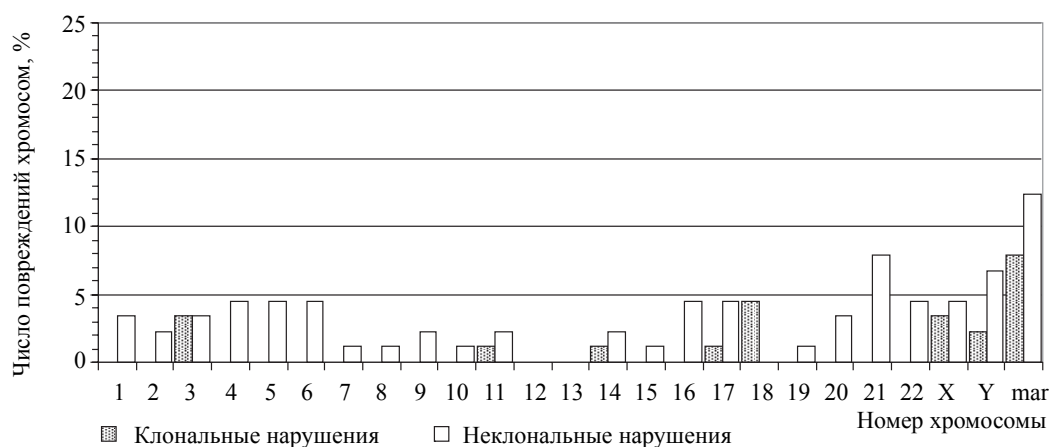


Рис. 1. Изменение числа хромосом (суммарное значение по периферической крови и костному мозгу), выявленное при цитогенетическом исследовании злокачественных лимфом

встречается в 1 % случаев (на рисунке не отражено). Выявленные численные нарушения в свою очередь согласуются с данными, представленными в [1, 4, 5]. Неклональные изменения состава хромосом встречаются гораздо чаще.

Следует отметить высокий уровень трисомии по 21 и Y. Некоторые авторы отмечают короткий срок жизни больных с трисомией по 21-й хромосоме [7]. Обращают на себя внимание очень редкие повреждения в локусе 18q21, в том числе и в составе транслокации (14;18) (q32; q21), что полностью соответствует данным Fleishman с соавт. [9].

На рис. 2 представлены структурные нарушения в хромосомах лимфоцитов периферической крови и костного мозга. Наиболее часто клональные повреждения наблюдаются в 1, 3, 6-й хромосомах (более 10 %). Что касается неклональных нарушений, то число их на порядок превышает число клональных. При этом наиболее существенное количество наблюдается в 1, 3, 6 и 7-й хромосомах. Кроме того, число данных нарушений велико и во 2, 4, 5, 9, 12, 17-й и X хромосомах. Более высокий уровень неклональных нарушений

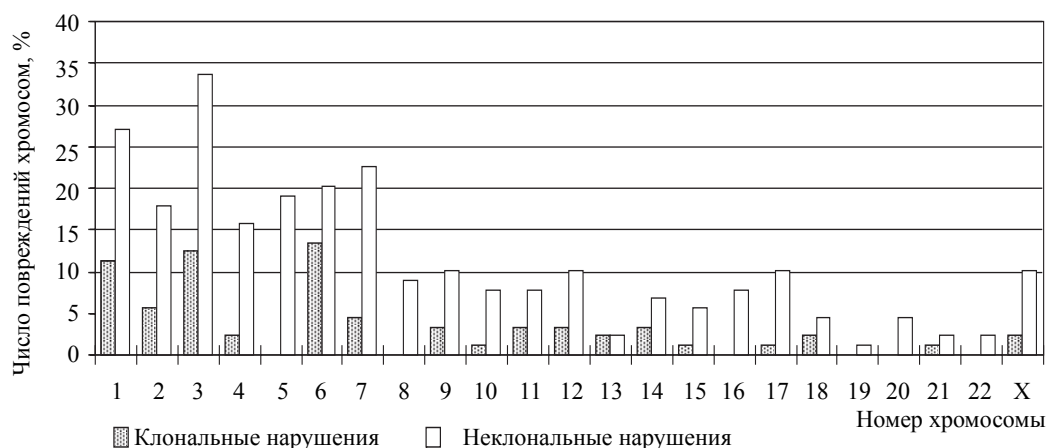


Рис. 2. Изменение структуры хромосом (суммарное значение по периферической крови и костному мозгу), выявленное при цитогенетическом исследовании злокачественных лимфом

по сравнению с клональными обусловлен, возможно, низкой способностью опухоли к диссеминации и требует большего числа анализируемых клеток [10].

Кроме того, степень разрешения стандартного цитогенетического анализа может быть ниже визуализации при различных перестройках, таких как парацентрические инверсии, небольшие делеции или реципрокные транслокации между схожими участками хромосом. Так, по данным [11] при использовании метода дифференциальной окраски хромосом повреждения выявляются только в том случае, если величина их превышает 5 % длины хромосомы.

Однако существует мнение, что неклональные нарушения, обнаруженные при реактивных лимфоидных гиперплазиях, могут быть показателем развития их в лимфомы [12].

На рис. 3 представлена локализация поврежденных участков хромосом при структурных aberrациях. Наиболее часто встречается локус в 1-й хромосоме, находящийся между 1p31-p21 и q25-32. В 3-й хромосоме — в p-плече — это локус 25 и аналогичный

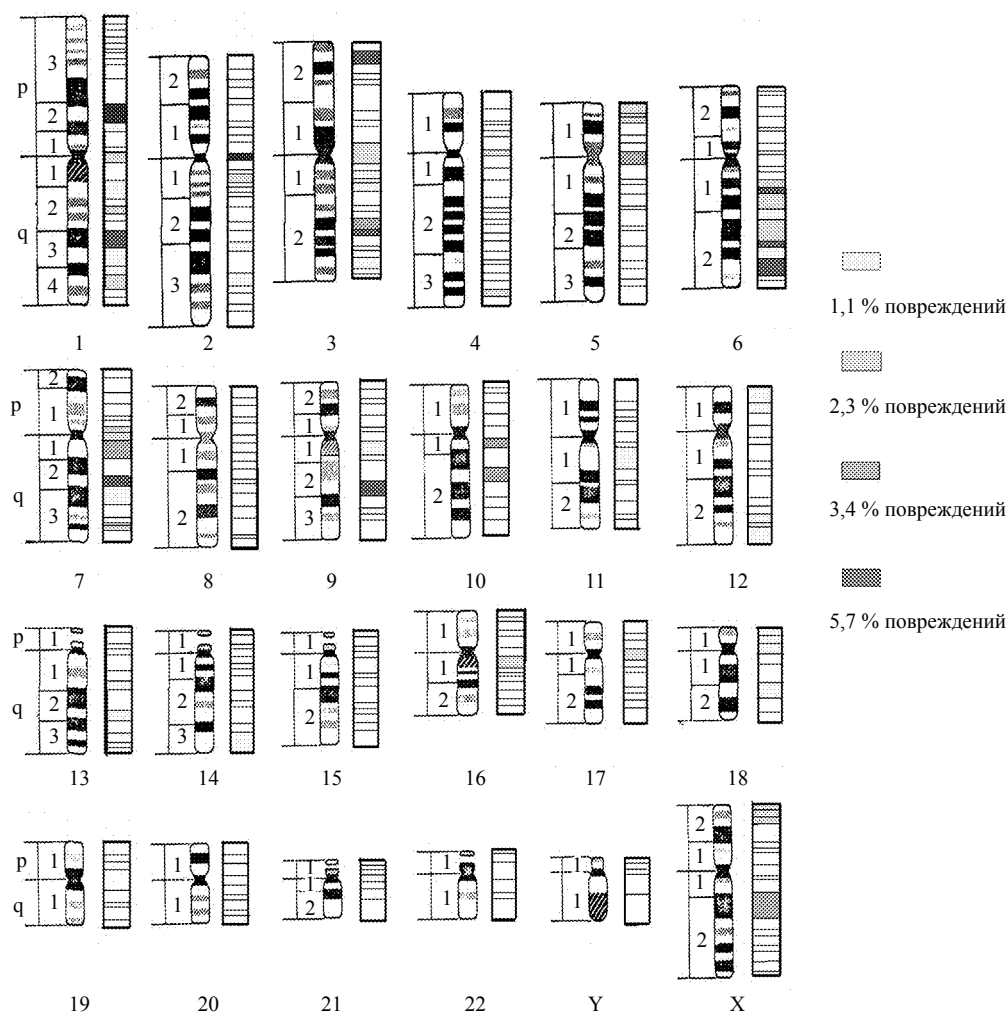


Рис. 3. Частота точек разрыва, выявленная в хромосомах при цитогенетическом исследовании злокачественных лимфом. Слева — схема Q-полос хромосом, обозначенная в соответствии с Международной номенклатурой; справа — повреждения, выявленные в работе

в q-плече. В 5-й хромосоме — p15. В 6-й хромосоме повреждается часто почти все q-плечо, как известно, в этом диапазоне находятся по крайней мере 6 генов-супрессоров опухолевого роста [13]. В 7-й хромосоме разрывы локализуются в участке q11.2 и в q22. В 9-й хромосоме наиболее часто повреждаемый участок — q22; в 10-й хромосоме — q11.2 и q22. В 14-й — локус — q 32, по данным литературы, наиболее часто подвержен различным перестройкам. Реципрокная транслокация, вовлекающая Ig локус и протоонкоген, является отличительной чертой многих типов В-клеточных лимфом. Вследствие этой транслокации происходит дерегуляция онкогена, контролируемого активным Ig локусом [14]. В 16-й хромосоме перестройкам подвержен участок — q12.1, в 17-й — p11.1–11.2; в 18-й — q21 (место локализации гена MALT 1 [15]); в X-хромосоме выражены 2 локуса — это p22.1 и q21.

При сравнении сайтов, наиболее часто вовлекаемых в различные структурные повреждения хромосом при лимфомах, с ломкими сайтами, индуцированными *in vitro* афидиколином [16], совпадают следующие: 1p21–23, 7q32, 9q31–32, Xp22 и Xq22. Это совпадение еще раз подтверждает, что ломкость хромосом является важным феноменом в отношении патогенеза опухолей [17–19] и, в частности, лимфом. Ломкие сайты являются специфичными участками хромосом, которые представляют собой точки разрыва, остающиеся незащищенными в клетках при воздействии химических агентов.

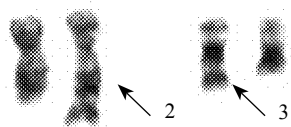


Рис. 4. Частичный кариотип из метафазных пластинок больного со злокачественной лимфомой (кариотип 46XY, t(2;3)(q37;q21)); указано место разрыва. Ув. 20х100. 2 и 3 — номера хромосом.

На рис. 4 представлен частичный кариотип из метафазной пластинки больного с лимфомой с реципрокной транслокацией между 2-й и 3-й хромосомами.

На основании представленных данных можно сделать следующие выводы.

Лимфоциты периферической крови являются удобным материалом для цитогенетического исследования лимфом при условии использования В- и Т-клеточных митогенов. Распределение характера хромосомных aberrаций соответствует данным литературы, за исключением транслокации между 14-й и 18-й хромосомами, которая, видимо, не специфична для фолликулярных лимфом в Северо-Западном регионе. Количество клеток с клональными нарушениями (%) не всегда коррелирует со стадией заболевания, что связано скорее всего со способностью опухолевых клеток к диссеминации.

Summary

Bogdanov A. N., Kolyubaeva S. N., Sarzhevsky V. O., Victorova N. A., Kissel A. V., Krasnova O. R., Titova A. A. Cytogenetic research of malignant lymphomas.

Cytogenetic research of bone marrow and peripheral blood was carried out in patients with malignant lymphomas at different stages of the disease. Mitogen, such as Phytohemagglutinin-M, which stimulates T lymphocytes or Pokeweed, which in general stimulates B lymphocytes was used. Correlation between the number of clone malignant cells and the stage of the disease was not revealed. 1/3 patients with abnormalities of the chromosome number were revealed. Break points were correlated with the range of fragile chromosome sites what was found during the cultivation with aphidicolin.

Key words: malignant lymphoma, lymphocytes, peripheral blood, structure injuries, stage of disease.

Литература

1. Mrozek K., Bloomfield C. D. Cytogenetics of non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease // Wiernik P. H. et al. Neoplastic diseases of the blood. 3-rd ed. New York et. al., 1996. P. 835–862.

2. Coiffier B. Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma // *Malignant lymphomas: Biology and treatment: an update*. Berlin: GA Pangalis. Springer, 1995. P. 399–406.
3. Prasad M., Warren G. S., Dennis D. W. et al. Detection of the t (2; 5) (p23; q35) and *NPM-ALK* fusion in non-Hodgkin's lymphoma by two-color fluorescence in situ hybridization // *Blood*. 1997. Vol. 89. № 5. P. 1678–1685.
4. Jaffe E. S., Harris N. L., Stein H. et al. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARCPress, 2001. P. 351.
5. Gersen S. L., Keagle M. B. The Principles of Clinical Cytogenetics. Totowa; New Jersey: Humana Press, 1999. P. 558.
6. Lambrechts A. C., Hupkes P. E., Dorssers L. C.J. et al. Translocation (14; 18) — positive cells are present in the circulation of the majority of patients with localized (stage I and II) follicular non-Hodgkin's lymphoma // *Blood*. 1993. Vol. 82. № 8. P. 2510–2516.
7. Aamot H. V., Torlakovic E. E., Eide M. B. et al. Non-Hodgkin lymphoma with t (14;18): clonal evolution patterns and cytogenetic-pathologic-clinical correlations // *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2007. Vol. 18. № 1.
8. An international system for human cytogenetic nomenclature / Ed. L. G. Shaffer, N. Tommerup. 2005. 130 p.
9. Fleischman E. W., Prigogina E. L., Ilynskaya G. W. et al. Chromosomal characteristics of malignant lymphoma // *J. Hum. Genet*. 1989. № 82. P. 343–347.
10. Wing Y. Au., Horsman Douglas E., Connors Joseph M. et al. Cytogenetic findings in reactive lymphoid hyperplasia: significance of non-clonal t (3; 14) and t (3; 22) // *Amer. J. of Hematol*. 2002. № 70. P. 133–138.
11. Dallapiccola B., Forabosco A. Human micro-cytogenetics // *Acta Med. Auxologica*. 1987. Vol. 19. P. 5–33.
12. Fan K., Kelly R., Kendrick V. Non-clonal lymphocytic proliferation in cutaneous lymphoid hyperplasia: a flow-cytometric and morphological analysis // *Dermatol*. 1992. № 185 (2). P. 113–119.
13. Merup M., Moreno T. C., Heyman M. 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas // *Blood*. 1998. Vol. 91. № 9. P. 3397–3400.
14. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis // *J. Nature Rev. Cancer*. 2005. Vol. 5. April. P. 251–262.
15. Borovecki A., Korac P., Ventura R. A. et al. MALT1, BCL10 and FOXP1 in salivary gland mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas // *J. Pathol. Int*. 2007. № 57 (1). P. 47–51.
16. Михайловская О. В., Колюбаева С. Н., Викторова Н. А. и др. Изучение взаимосвязи между ломкостью хромосом и лимфопролиферативными заболеваниями // *Цитология*. 2005. Т. 47. № 1. С. 83–88.
17. Imyaninov E., Hanson K., Zhivotovsky B. Polymorphic variations in apoptotic genes and cancer predisposition // *Cell Death and Differentiation*. 2005. № 12. P. 1004–1007.
18. Butler M. P., Iida S., Capello D. et al. Alternative translocation breakpoint cluster region 5' to BCL-6 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma // *J. Cancer Res*. 2002. July 15. P. 4089–4094.
19. Summers K. E., Goff L. K., Wilson A. G. et al. Frequency of the *Bcl-2/IgH* rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma // *J. Clin. Oncol*. 2001. Vol. 19. № 2. P. 420–424.

Статья принята к печати 21 мая 2008 г.