

ЗАМЕТКИ ИЗ ПРАКТИКИ

© И. П. Шабалкин, 1996
УДК 616.155.392-071

И. П. Шабалкин

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОМА КЛЕТКИ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЕМОБЛАСТОЗОВ У ДЕТЕЙ

*Отдел молекулярно-биологических и радиоизотопных методов
исследования*

Диагностика злокачественных заболеваний системы кроветворения по цитологическим препаратам нередко бывает затруднена, так как цитологическая характеристика объекта по различным причинам может быть нетипична для данной формы заболевания. Это ставит перед практической медициной задачу разработки новых методических приемов, которые позволили бы клиницисту получать все более точную информацию о характере болезни пациента. Потребность в этом обусловлена и необходимостью разработки количественных критериев оценки эффективности лечения гемобластозов. Для этих целей мы предлагаем использовать метод оценки функциональной активности генома клетки [2]. Метод основан на цитофотометрическом анализе клеточной популяции после окраски ядра клетки, по Фельгену (окраска на ДНК), и нафтоловым желтым S (окраска на гистоны). Для количественного определения функциональной активности генома клетки используют показатель $K_{\text{фaгeн}}$ — коэффициент функциональной активности генома, который выведен из отношения величин гистон/ДНК после определения в условных единицах оптической плотности ядра клетки. Данный метод дает возможность определить в анализируемой популяции количество клеток, отклоняющихся от нормы по функциональной активности их генома. Различный характер распределения клеток по величине значений $K_{\text{фaгeн}}$ можно использовать в качестве теста при дифференциальной диагностике злокачественных заболеваний системы кроветворения. Наряду с этим по гистограммам, построенным на основе определенных значений $K_{\text{фaгeн}}$, можно как следить за динамикой течения заболевания, так и количественно оценить эффективность его лечения. Степень различия между двумя сравниваемыми гистограммами анализируемых популяций клеток определяется по показателю C . Величина C складывается из количества клеток больного (опыт), превышающих число клеток донора (контроль) в одном и том же разряде сравниваемых гистограмм, и числа клеток опыта, не имеющих значений $K_{\text{фaгeн}}$.

NOTES FROM PRACTICE

I. P. Shabalkin

EVALUATION OF CELL GENOME FUNCTIONAL ACTIVITY AS APPLIED FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF HEMOBLASTOSES IN CHILDREN

*Department of Molecular Biological and Radioisotopic Methods
of Investigations*

Diagnosis of hemopoietic malignancies basing on cytological specimens is often difficult because cytological characteristics of the object may be atypical for the given disease form due to a variety of reasons. Therefore the necessity arises to develop new methods for clinicians to derive more accurate information about the nature of disease in question. There is also the need in quantitative criteria for evaluation of hemoblastosis treatment efficacy. We propose to evaluate cell genome functional activity by a method described in [2]. The method involves cytophotometry of cell population after staining of cellular nuclei according to Feulgen (DNA staining) and with naphthol blue S (histone staining). To make quantitative evaluation of cell genome functional activity we used the parameter C_{fagen} . C_{fagen} , i. e. coefficient of functional activity of genome, was derived from histone/DNA ratio as determined in conventional units of cell nuclear optical density. This method allows determination of the number of cells different from normal cells by their genome functional activity. The difference in cell distribution with respect to C_{fagen} may be used in differential diagnosis of hemopoietic malignancies. Besides, histograms based on C_{fagen} values may be applied to monitor disease course and to assess treatment efficacy. The difference between two histograms of cell populations compared is measured basing on a parameter C . The C value shows the number of patient's (test) cells exceeding the number of donor's (control) cells in the same histogram group and the number of test cells having no C_{fagen} values similar to control cells. C is expressed as percentage. The examples below demonstrate the practical application of the method in several cases managed at the Institute of Pediatric Oncology CRC RAMS (Moscow).

Leukemia is a common type of pediatric malignancy whose diagnosis is based on identification of leukemic cell types and differentiation degree. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is mainly characterized by low degree of differentiation while acute myeloid leukemia (AML) by high differentiation degree. However, there are

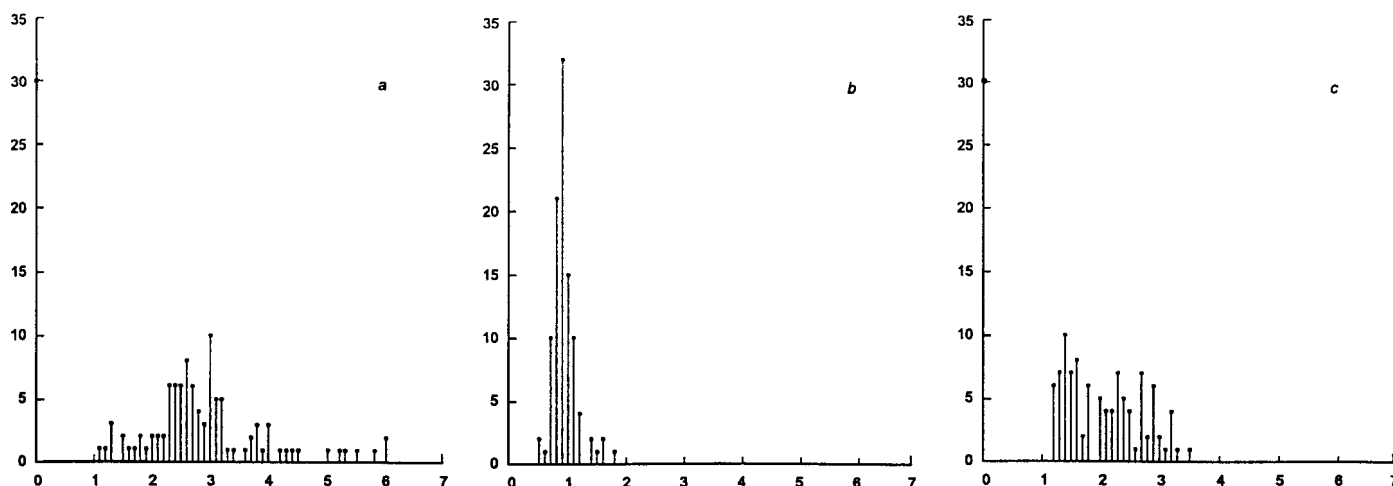


Рис. 1. Гистограммы распределения клеток костного мозга в зависимости от изменения величины C_{fagen} при миелобластном (а), лимфобластном (б) лейкозе и миелобластной саркоме (с) у детей.

Здесь и на рис. 2—4: по оси абсцисс — значение C_{fagen} ; по оси ординат — частота встречаемости клеток с определенным значением C_{fagen} .

Fig. 1. Distribution histograms of bone marrow cells with respect to C_{fagen} in children with myeloblastic leukemia (a), lymphoblastic leukemia (b) and myeloblastic sarcoma (c).

Here and in figs. 2-4 numbers on the x axis show C_{fagen} values, numbers on the y axis show frequency of cells with a certain C_{fagen} value.

аналогичных клеткам контрольной популяции. Показатель C выражается в процентах. Ряд приведенных ниже примеров, основанных на результатах наблюдений за группой больных, проходивших курс лечения в НИИ детской онкологии ОНЦ РАМН (Москва), свидетельствует о возможности использования предлагаемого метода в медицинской практике.

Известно, что одной из распространенных форм опухолевого роста у детей являются лейкозы, диагностика которых основывается на идентификации типа лейкозных клеток и уровне их дифференцировки. При этом для острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), как правило, характерна низкая степень дифференцировки, для острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) — высокая. Однако встречаются и такие варианты гемобластозов, диагностика которых затруднена. Например, до настоящего времени дискутируется вопрос о том, что собой представляют гематосаркомы: лейкозы с опухолевыми разрастаниями или саркомы с вторичным лейкозом. Поэтому современная диагностика гемобластозов, на наш взгляд, должна основываться на комплексной оценке иммунологических, биохимических, морфологических параметров клеток, составной частью которых может быть и такой показатель, как C_{fagen} . Иллюстрацией к сказанному служит наблюдение 1.

Наблюдение 1. Как видно из представленных гистограмм (рис. 1), различным типам гемобластозов соответствует разный модальный класс клеток (максимальное количество клеток с определенным значением C_{fagen} при совершенно разных формах гистограмм. При этом для лимфобластного лейкоза характерен сдвиг гистограмм влево, т. е. в сторону уменьшения значений C_{fagen} , для миелобластного лейкоза — вправо.

Наблюдение 2. Интересно, что один из вариантов миелобластного лейкоза — М2 — по клинко-гематологическим данным нередко бывает затруднительно отличить от миелосаркомы (гранулоцитарной саркомы),

гемобластозов difficult for diagnosis. For example, the question whether hematosarcoma is leukemia with neoplastic growth or sarcoma with secondary leukemia is still disputed. We believe therefore that diagnosis of hemoblastosis should be based on complex evaluation of cellular immunological, biochemical, morphological profile including C_{fagen} . Consider case 1.

Case 1. As seen in the histograms (fig. 1) different modal classes of cells (maximal number of cells with a certain C_{fagen} value and in different forms of histograms) correspond to different hemoblastosis types. Histogram shift to the left (to smaller C_{fagen} values) is characteristic of lymphoblastic leukemia, while the shift to the right is typical for myeloblastic leukemia.

Case 2. The M2 variant of myeloblastic leukemia is difficult to differentiate from myeloid sarcoma (granulocytic sarcoma) by clinical hematological characteristics, and there are but few publications [1] on myeloid sarcoma diagnosis in children. Our method may be used successfully in this case. Cell distribution histograms (fig. 2) of AML type M2 and myeloid sarcoma by C_{fagen} show marked distinction in some characteristics.

First, the AML M2 histogram is shifted to the left (see fig. 2, a) from the myeloid sarcoma histogram (see fig. 2, b) which means a lower degree of differentiation of M2 cells as compared to myeloid sarcoma. Secondly, as concerns the parameter C : fraction of myeloid sarcoma cells different from M2 myeloid leukemia by C_{fagen} is 54% which suggests some difference in changes of cell genome functional activity in populations studied (see fig. 2, c). Note that C is a polyfunctional parameter. For instance, it may be used as a criterion in quantitative evaluation of treatment efficacy in some diseases (case 3).

Case 3. Patient F. was admitted to the Pediatric Clinic of CRC RAMS with the diagnosis of lymphosarcoma to receive chemotherapy. Treatment results as histograms are presented in fig. 3. As seen in fig. 3, a,

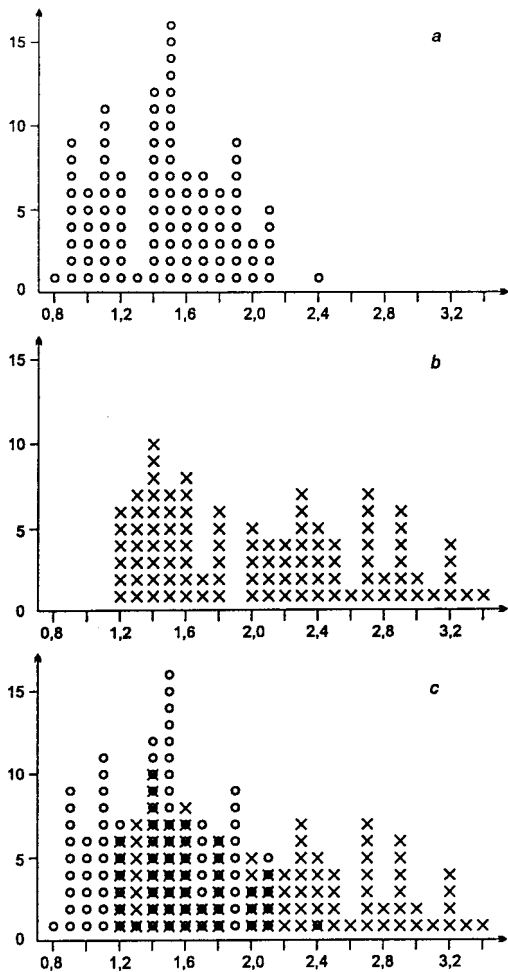


Рис. 2. Распределение клеток костного мозга по критерию $C_{\text{фaгeн}}$ у детей, больных разными формами миелобластозов. а — M2-вариант острого миелоидного лейкоза; б — крестики — миелоидная саркома; в — оценка показателя С по гистограммам, соответствующим M2-форме миелолейкоза и миелоидной саркомы.

Fig. 2. Bone marrow cell distribution with respect to C_{fagen} in children with various myeloblastosis types.

circles represent M2 acute myeloid leukemia; b, crosses represent myeloid sarcoma; c, C values as assessed by histograms of myeloid leukemia M2 and myeloid sarcoma.

как по вопросу диагностики миелосаркомы у детей являются лишь отдельные исследования [1]. В этом случае целесообразно воспользоваться предлагаемым методом. Сравнение гистограмм (рис. 2) распределения клеток по критерию $C_{\text{фaгeн}}$ для M2-варианта ОМЛ и миелосаркомы действительно показывает, что анализируемые гистограммы различаются между собой по ряду признаков.

Во-первых, по форме: гистограмма M2-варианта ОМЛ сдвинута влево (см. рис. 2, а) относительно гистограммы миелоидной саркомы (см. рис. 2, б), что свидетельствует о более низкой степени дифференцировки клеток M2 по сравнению с миелосаркомой. Во-вторых, по показателю С, доля клеток в популяции миелоидной саркомы, различающихся по значениям $C_{\text{фaгeн}}$ от клеток популяции M2-варианта миелолейкоза, достигает 54%, что указывает на разный характер изменений функциональной активности генома клеток в анализируемых популяциях (см. рис. 2, в). Надо отметить, что величина С

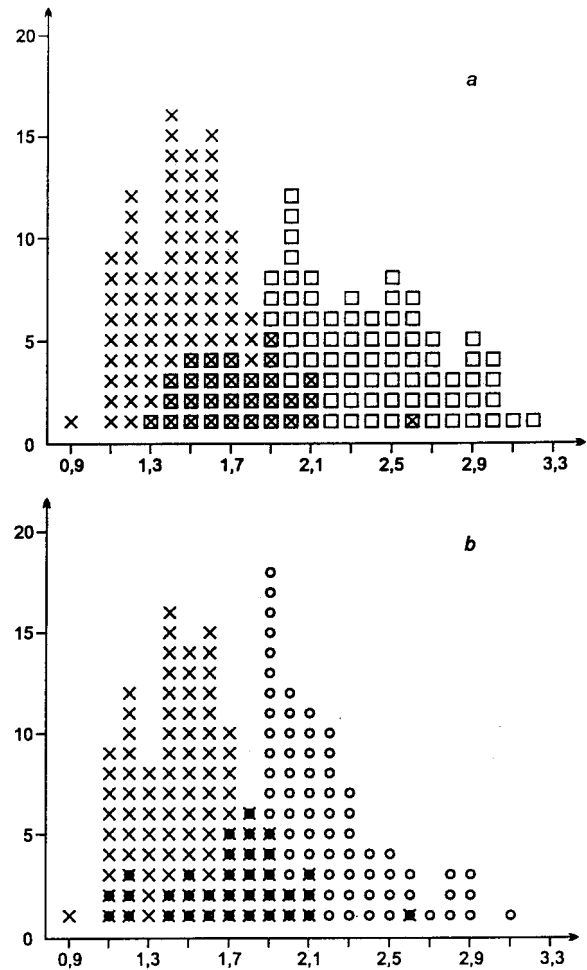


Рис. 3. Распределение клеток костного мозга по критерию $C_{\text{фaгeн}}$ у больного Ф. до и после лечения лимфосаркомы. а — контроль, донор № 105 (квадраты); б — до лечения (крестики) и после него (кружки).

Fig. 3. Bone marrow cell distribution with respect to C_{fagen} in Patients F. before and after treatment for lymphosarcoma. a, control (donor No. 105); b, crosses represent cells before treatment, circles represent cells following treatment.

before treatment 71% of bone marrow cells (parameter C) were shifted to the left from the normal position. Bone marrow from a donor (No. 105) supplied by the bone marrow bank of CRC RAMS was used as control. After chemotherapy 69% of the cells were shifted to the right from the baseline histogram by $C_{\text{фaгeн}}$ (see fig. 3, b). The fact that 69% of bone marrow cells of the patient demonstrated deviation to the normal side by $C_{\text{фaгeн}}$ was evidence of treatment efficiency.

The cases considered prove high resolving capacity of the method. As concerns sensitivity, the method allows monitoring of changes in patient's bone marrow cell population even in remission as assessed by the basic hematological characteristic, i.e. blast percentage (case 4).

Case 4. Patient Kh. with the diagnosis of ALL was in remission during 1991-1992 as assessed by cytology (blasts were not more than 3% of bone marrow cell population). But clinically the patient presented with extramedullary recurrence (affection of soft tissues of right maxillary sinus). Changes associated with this disease manifested themselves as difference in bone marrow cell

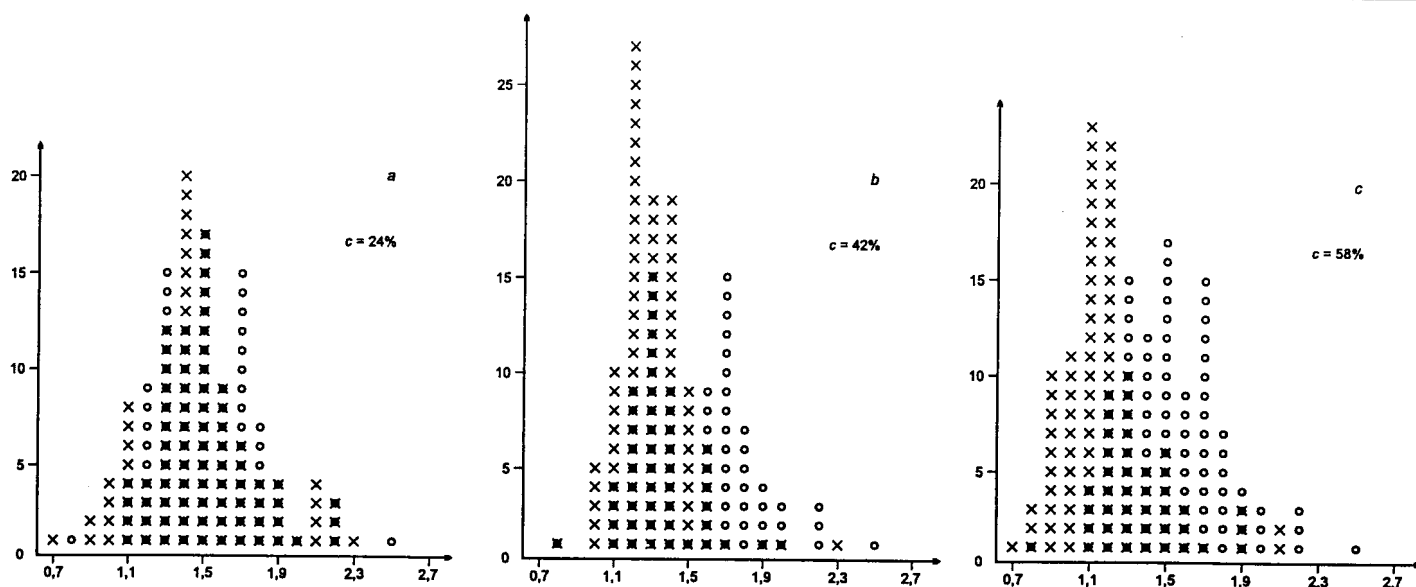


Рис. 4. Динамика изменения состояния популяции клеток костного мозга по критерию $K_{\text{фaгeн}}$ больного X. при экстрамедуллярном рецидиве.

а — март 1991 г., б — декабрь 1991 г., с — март 1992 г.

Условные обозначения: кружки — контроль (донор № 105), крестики — динамика изменений.

Fig. 4. Changes in bone marrow cell population by C_{fagen} in Patient Kh. with extramedullary recurrence.

a, b, c, circles represent control (donor No. 105); crosses show changes a in March 1991, b in December 1991, c in March 1992.

является полифункциональным показателем. Например, его можно использовать в качестве критерия для количественной оценки эффективности лечения того или иного заболевания (наблюдение 3).

Наблюдение 3. Больному Ф., поступившему в детскую клинику ОНЦ РАМН с диагнозом лимфосаркомы, был проведен курс химиотерапии. Результаты лечения, отраженные в гистограммах, представлены на рис. 3. Как видно на рис. 3, а, у больного перед началом лечения 71% клеток костного мозга (показатель С) отклоняется от контроля влево. В качестве контроля в данном случае использовался костный мозг донора (№ 105), взятый из банка костного мозга ОНЦ РАМН. После химиотерапевтического лечения сравнительный анализ гистограмм больного (см. рис. 3, б) показал, что 69% клеток по критерию $K_{\text{фaгeн}}$ отклоняется вправо относительно гистограммы до лечения. Тот факт, что после химиотерапии 69% клеток костного мозга больного, по значениям $K_{\text{фaгeн}}$, отклоняется в сторону нормы, подтверждает эффективность выбранной программы лечения.

Результаты рассмотренных наблюдений свидетельствуют о том, что предлагаемый метод обладает высокой разрешающей способностью. Чувствительность данного метода такова, что позволяет следить за динамикой изменения состояния популяции клеток костного мозга больного даже в тех случаях, когда по основному гемоцитологическому показателю (проценту бластных клеток) популяция костного мозга больного находится в состоянии, близком к норме, т. е. в ремиссии (наблюдение 4).

Наблюдение 4. Больной X., имеющий диагноз ОЛЛ, в течение 1991—1992 гг. по цитологическим показателям находился в состоянии ремиссии, так как доля бластных клеток в популяции костного мозга больного не превышала 3%. Однако клинически у больного обнаружен экстрамедуллярный рецидив (поражение

популяции по $C_{\text{фaгeн}}$ (fig. 4). As seen in the figure, the solid tumor pathologic growth proceeded in parallel with increase in percentage of bone marrow cells different from the control (donor No. 105) by cell genome functional activity. These changes in bone marrow population are directed to lower differentiation in the population which is characteristic of ALL progression.

In conclusion I should like to say that this method is surely not unique, but it is simple and informative, and thus easy to apply in the medical practice.

мягких тканей правой верхнечелюстной пазухи). Изменения, связанные с развитием данного заболевания, нашли свое отражение в характере перестройки популяции костного мозга больного, по критерию $K_{\text{фaгeн}}$ (рис. 4). Как видно на рис. 4, по мере патологического роста солидной опухоли в популяции костного мозга больного увеличивается доля клеток, отклоняющихся от контроля (донор № 105) по функциональной активности их генома. Причем эти изменения в популяции костного мозга направлены в сторону снижения дифференцировки в анализируемой популяции, что характерно для картины развития ОЛЛ.

В заключение следует сказать, что предлагаемый метод, безусловно, не является всеобъемлющим и уникальным, однако он прост и информативен, что позволяет надеяться на его использование в медицинской практике.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Протасова А. К. Морфофункциональная характеристика вариантов острого миелоидного лейкоза у детей: Автореф. ... д-ра мед. наук. — М., 1992.
2. Шабалкин И. П. // Биология репродукции клеток. — М., 1994.

Поступила 20.09.95 / Submitted 20.09.95