

АНАЛИЗ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Кристина Александровна ЗАКУРДАЕВА, Владимир Петрович ИВАНОВ, Ирина Анатольевна МАНДРИК

ГОУ ВПО Курский государственный медицинский университет Росздрава
305033, г. Курск, ул. К. Маркса, 3а

Произведено кариотипирование клеток костного мозга и периферической крови больных острым лейкозом. Установлены основные типы хромосомных перестроек, среди которых преобладают транслокации, моносомии и изменение ploidy кариотипа. Выявлена статистически достоверная прямая зависимость наличия хромосомных аномалий в клетках периферической крови от уровня бластемии ($R = 0,86$ при $p < 0,005$).

Ключевые слова: острые лейкозы, кариотип, хромосомные перестройки, бластные клетки.

В настоящее время цитогенетический анализ в гематологии играет важную роль в диагностике, прогнозировании течения заболевания и оценке эффективности применяемой терапии [1–3]. Некоторые хромосомные нарушения строго ассоциируются с характерной клинической картиной и подтипом заболевания и в этом случае являются дополняющими, а в некоторых случаях и определяющими признаками онкогематологической патологии. Данные литературы свидетельствуют, что при типичных для лейкозов хромосомных аномалиях смена локализации и/или повреждение структуры генов могут приводить к нарушению их экспрессии или к структурно-функциональным изменениям кодируемых ими белков. По-видимому, эти изменения играют интегральную роль в патогенезе, а возможно, и прогрессировании лейкоза [4–8]. Основными методами забора материала для цитогенетического исследования служат венепункция и пункция костного мозга. Целесообразность исследования того или иного материала определяется индивидуально.

Для многих изученных гемобластозов выявлены специфические (неслучайные) хромосомные аномалии, маркирующие те участки хромосом, в которых локализованы гены, непосредственно участвующие в лейкозогенезе [9, 10]. Тем не менее, на современном этапе продолжается поиск новых неслучайных хромосомных перестроек при острых лейкозах и выявление их взаимосвязей с течением и прогнозом заболевания, эффективностью проводимой терапии [11].

Цель настоящего исследования — изучение и сравнение кариотипов клеток костного мозга и периферической крови больных острым лейкозом, а также исследование зависимости наличия хромосомных aberrаций в клетках стерального

пунктата и периферической крови от уровней бластоза костного мозга, лейкоцитоза и бластемии.

Материал и методы

Материалом исследования послужили клетки костного мозга, полученного при стеральной пункции, и периферической крови пациентов гематологического отделения Курской областной клинической больницы. Соблюдались единые условия забора материала, культивирования и фиксации. Культивирование клеток костного мозга и периферической крови обследованных лиц проводилось общепринятым методом, описанным Hungerford и Moorhead, с некоторыми модификациями лаборатории [12, 13]. Остановку клеточного деления на стадии метафазы производили с помощью цитостатиков — колхицина и колцемиды. Фиксацию культур выполняли общепринятым методом с помощью смеси этилового спирта и уксусной кислоты в соотношении 3:1. Препараты готовили раскапыванием осадка клеточной суспензии на влажные охлажденные тонкие стекла на пару или с последующим обжигом над огнем спиртовки.

Полученные препараты окрашивали по методу Гимза с применением раствора трипсина 0,25%-ного и анализировали под микроскопом «Zeiss» при увеличении $\times 1200$. Метафазные пластинки фотографировали при помощи системы «OLYMPUS», с использованием программ «ImageScope» и «KaryoService».

Подсчет лейкоцитов осуществляли общепринятым методом в счетной камере Горяева; подсчет бластных клеток производили при микроскопии мазка периферической крови или стерального пунктата на 100 клеток.

Статистический анализ включал методы описательной статистики, корреляционного и мно-

Закурдаева К.А. — соискатель кафедры биологии, медицинской генетики и экологии,
e-mail: chris.tina_z@yahoo.com

Иванов В.П. — д.м.н., проф., зав. кафедрой биологии, медицинской генетики и экологии, академик РАЕН,
заслуженный деятель науки РФ

Мандрик И.А. — к.б.н., старш. преподаватель кафедры биологии, медицинской генетики и экологии

Таблица 1

Основные типы хромосомных аномалий, выявленных в клетках костного мозга больных острым лейкозом

Типы хромосомных перестроек	Число больных	Процентное выражение числа больных
Транслокации:	21	21,65
t(1;3)	1	1,03
t(8;21)	7	7,22
t(9;11)	2	2,06
t(9;22)	6	6,19
t(10;11)	1	1,03
t(11;14)	2	2,06
t(15;17)	2	2,06
Изменения ploидности:	14	14,43
гипердиплоидия (более 50 хромосом)	9	9,28
гипоплоидия	5	5,15
Моносомии:	13	13,40
-5	3	3,09
-7	4	4,12
-18	3	3,09
-20	2	2,06
-Y	1	1,03
Трисомии:	6	6,19
+8	2	2,06
+13	1	1,03
+21	3	3,09
Инверсии:	6	6,19
inv(3)	1	1,03
inv(16)	5	5,15
Делеции:	3	3,09
del(9q)	1	1,03
del(11q)	2	2,06
Сложный кариотип	1	1,03
Нормальный кариотип	33	34,02
Всего	97	100,00

гомерного анализа. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ «Microsoft Excel» и «Statistica 6.0».

В группу исследования вошли 97 пациентов с первично диагностированным острым лейкозом, из них 74 — с острым миелобластным лейкозом и 23 — с острым лимфобластным лейкозом. Средний возраст больных (равный возрасту манифестации заболевания) составил $46,99 \pm 12,51$ лет. Группа контроля включала 70 практически здоровых лиц и не отличалась от группы исследования по возрасту и половому составу.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых, использованные методы не противоречили принятым этическим нормам и были одобрены Комитетом по биоэтике региона.

Результаты и обсуждение

В ходе цитогенетического исследования изменения со стороны хромосомного аппарата обнаружены в 65,98 % клеток костного мозга и в 32,99 % клеток периферической крови пациентов.

При кариотипировании клеток стернального пунктата больных острым лейкозом были выявлены следующие типы хромосомных аномалий: изменения ploидности хромосом (гипер- и гипоплоидия) встречались в 14,43 % случаев; моносомии — в 13,4 % случаев, трисомии — в 6,19 % случаев; различные виды транслокаций, такие как t(8;21), t(9;22), t(9;11) и другие, наблюдались у 21,65 % пациентов; инверсии обнаружены у 6,19 % больных; делеции — в 6,19 % случаев; у одного пациента выявлен сложный кариотип, включающий 3 и более aberrаций; нормальный кариотип

Таблица 2

Матрица коэффициентов корреляции исследуемых цитогенетических показателей

	Лейкоцитоз	Бластемия	Бластоз костного мозга	Аберрации в костном мозге	Аберрации в крови
Лейкоцитоз	1,00				
Бластемия	0,44*	1,00			
Бластоз костного мозга	0,24	0,56*	1,00		
Аберрации в костном мозге	0,37*	0,39*	0,68*	1,00	
Аберрации в крови	0,49*	0,86*	0,55*	0,54*	1,00

Примечание: * – корреляции статистически достоверны при $p < 0,05$.

(46,XX; 46,XY) отмечен в 34,02 % случаев. Все обнаруженные в ходе исследования хромосомные аномалии были ранее описаны в литературе [1, 2, 6, 14]. Были выявлены такие редкие аномалии, как транслокации $t(1;3)$ и $t(6;11)$, инверсия $inv(3)$. Основные типы хромосомных аномалий, обнаруженных в клетках костного мозга больных острым лейкозом, отражены в **табл. 1**.

Проведен сравнительный анализ зависимости между наличием хромосомных аберраций в клетках стерального пунктата и периферической крови больных острым лейкозом, количеством лейкоцитов в периферической крови (в абсолютных числах), уровнем бластемии (количеством бластных клеток в периферической крови) и бластоза костного мозга (**табл. 2**). Результаты анализа продемонстрировали наличие статистически достоверных корреляций между вышеперечисленными цитогенетическими показателями.

Проведенный многомерный анализ показал наличие тесных корреляционных взаимосвязей между уровнем бластемии и количеством хромосомных аберраций в клетках периферической крови и уровнем бластоза костного мозга и количеством хромосомных аберраций в клетках костного мозга ($R = 0,86$ и $0,68$ соответственно), которые образовали самостоятельные кластеры и представили собой независимые статистические совокупности. **Рисунок** отражает выраженную зависимость наличия

хромосомных аберраций в клетках периферической крови от уровня бластемии, а в клетках костного мозга – от степени его бластоза. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что чем больше количество бластных клеток, вышедших в периферическую кровь, тем больше вероятность обнаружения в них хромосомных аберраций.

Дальнейший анализ показал, что выявление хромосомных аберраций в клетках периферической крови наиболее вероятно при наличии в лейкоформуле более 49 % бластных клеток, что важно при решении вопроса о необходимости взятия дополнительного материала от больного и может играть существенную роль в снижении степени инвазивности проводимых исследований.

Закключение

Таким образом, кариотипирование клеток костного мозга и периферической крови больных острым лейкозом позволило выявить целый ряд разнообразных хромосомных аберраций, играющих важную роль в патогенезе и прогрессировании острых лейкозов. Обнаруженная прямая зависимость между уровнем бластемии и наличием изменений со стороны хромосомного аппарата клеток периферической крови пациентов позволяет более четко определять, какой материал целесообразно использовать для цитогенетического исследования и, тем самым, предотвратить дополнительный забор крови.

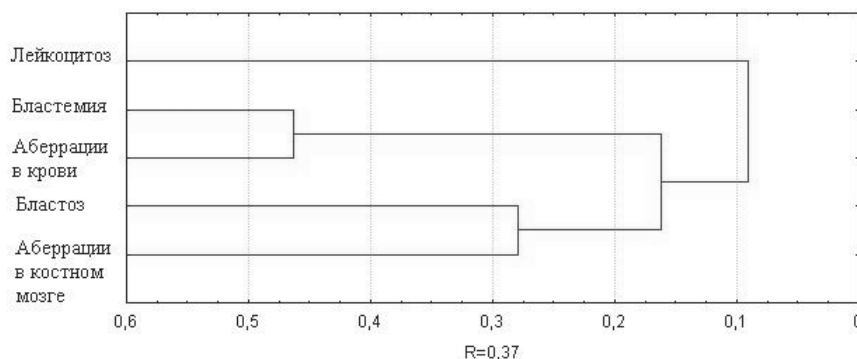


Рис. Дендрограмма матрицы исследуемых цитогенетических показателей.

Благодарности

Авторы выражают благодарность коллективам лаборатории кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Курского государственного медицинского университета и гематологического отделения Курской областной клинической больницы за сотрудничество и всестороннюю помощь, а также коллективу лаборатории цитогенетики Российского онкологического научного центра им. Блохина РАМН за помощь в освоении методики культивирования костного мозга при острых лейкозах.

Список литературы

1. Волкова М.А. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей. М.: Медицина, 2001. 576 с.
Volkova M.A. Clinical Oncohematology: Guideline for Doctors. M.: Meditsina, 2001. 576 p.
2. Воробьев А.И. Руководство по гематологии 1–3 тт. с приложениями. 4-е изд. М.: НЬЮДИА-МЕД, 2007. 1275 с.
Vorobyov A.I. Guideline in hematology with applications. 4th ed. M.: N'YUDIAMED, 2007. 1275 p.
3. Домрачева Е.В., Асеева Е.А. Достижения и перспективы гематологической цитогенетики (по материалам кариологической лаборатории ГНЦ РАМН) // Гематол. и трансфузиол. 2001. 46. (3). 14–18.
Domracheva E.V., Aseeva E.A. Progress and prospective of cytogenetics in hematology // Gematol. i transfusiol. 2001. 46. (3). 14–18.
4. Белохвостов А.С., Румянцев А.Г. Онкомаркеры: молекулярно-генетические, иммунохимические, биохимические анализы: Пособие для врачей. М.: МАКС Пресс, 2003. 92 с.
Belohvostov A.S., Rumyantsev A.G. Oncomarkers: molecular genetrical, immunochemical, biochemical tests: Manual for Doctors. M.: MAKs Press, 2003. 92 p.
5. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика (учебное пособие). – М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2006.
Vorsanova S.G., Yurov Yu. B., Chernyshev V.N. Medical cytogenetics (study guidebook). M.: MEDPRAKTIKA-M, 2006.
6. Ольшанская Ю.В. Хромосомные перестройки при острых лейкозах. М.: МЕДпресс-информ, 2006. 112 с.
Olshanskaya Yu.V. Chromosome abnormalities at acute leukemia. M.: MEDpress-inform, 2006. 112 p.
7. Флейшман Е.В., Сокова О.И., Кириченко О.П. и др. Редкая неслучайная хромосомная транслокация t(6;11) при остром лейкозе // Гематол. и трансфузиол. 2001. 46. (5). 9–11.
Fleishman E.V., Sokova O.I., Kirichenko O.P. et al. Rare non-prioritized chromosome translocation t(6;11) at acute leukemia // Gematol. i transfusiol. 2001. 46. (5). 9–11.
8. Mueller R.F., Young I.D. Emery's Elements of medical genetics. 11th ed. Churchill Livingstone, 2001. 189–208.
9. Флейшман Е.В., Сокова О.И., Пона А.В. и др. Дополнительные аномалии кариотипа при остром миелобластном лейкозе с транслокацией t(8; 21) // Гематол. и трансфузиол. 2003. 48. (2). 10–13.
Fleishman E.V., Sokova O.I., Popa A.V. et al. Additional abnormalities of karyotype at acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) at acute leukemia // Gematol. i transfusiol. 2003. 48. (2). 10–13.
10. Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г., Верный М.А. и др. Острые лимфобластные лейкозы с перестройками генов BCR-ABL // Тер. арх. 2005. (7). 16–22.
Parovichnikova E.N., Savchenko V.G., Vern'yuk M.A. et al. Acute lymphoid leukemia with abnormalities of genes BCR-ABL // Ter. arkh. 2005. (7). 16–22.
11. Моисеев С.И., Мартынкевич И.С. и др. О значении цитогенетических исследований в процессе лечения острого миелобластного лейкоза // Гематол. и трансфузиол. 1996. 41. (1). 41–42.
Moiseev S.I., Martynkevich I.S. et al. Significance of cytogenetic analysis in the treatment of acute myeloid leukemia // Gematol. i transfusiol. 1996. 41. (1). 41–42.
12. Dallman M.J., Lamb J.R. Haematopoietic and lymphoid cell culture (Handbooks in practical animal cell biology). Cambridge University Press, 2000.
13. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J. et al. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood // Exp. Cell Res. 1960. 20. 613–616.
14. Byrd J.C., Mrozek K., Dodge R.K. et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB8461) // Blood. 2002. 100. (13). 4325–4336.

ANALYSIS OF CHROMOSOME ABNORMALITIES IN CELLS OF BONE MARROW AND PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA

Kristina Aleksandrovna ZAKURDAEVA, Vladimir Petrovich IVANOV, Irina Anatolyevna MANDRIK

*Kursk State Medical University of Roszdrav
305033, Kursk, K. Marks st., 3a*

The karyotypic analysis of bone marrow and peripheral blood cells is performed on samples from patients with acute leukemia. The predominant types of chromosome abnormalities are determined; the most widespread among them are translocation, monosomy and abnormalities of ploidy. The statistically significant direct relationship in the presence of chromosome abnormalities in peripheral blood cells to the level of blastemia is identified ($R = 0,86$ at $p < 0,005$).

Key words: acute leukemia, karyotype, chromosome abnormalities, blast cells.

*Zakurdaeva K.A. – post-graduate of the department of biology, medical genetics and ecology,
e-mail: chris.tina_z@yahoo.com*

Ivanov V.P. – doctor of medical sciences, professor, head of the department of biology, medical genetics and ecology, academician of RANS, honored scientist of the RF

Mandrik I.A. – candidate of biological sciences, assistant professor of the department of biology, medical genetics and ecology