

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ЛИМФОМАХ ХОДЖКИНА

КОЛЮБАЕВА С. Н., НОВИЦКИЙ А. В., МЯКОШИНА Л. В., ИЛЬИН Н. В.,
ВИНОГРАДОВА Ю. Н., ЕВТУШЕНКО В. И., ВИКТОРОВА Н. А.,
КРАСНОВА О. Р., ТИТОВА А. А.

ФГОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ,
ФГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий»,
Санкт-Петербург

Колубаева С. Н., Новицкий А. В., Мякошина Л. В., Ильин Н. В., Виноградова Ю. Н., Евтушенко В. И., Викторова Н. А., Краснова О. Р., Титова А. А. Диагностическое значение цитогенетического исследования лимфоцитов периферической крови при лимфомах Ходжкина // Мед. академ. журн. 2009. Т. 9. № 3. С. 47–51. ФГОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург, 194175, ул. Академика Лебедева, 6; ФГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург, 197758.

Приведены данные цитогенетического анализа 84 пациентов с лимфомой Ходжкина, полученные с помощью метода дифференциальной окраски хромосом. Клональные изменения выявлены у 22 пациентов, при этом наибольшее число повреждений наблюдалось в хромосомах 3, 6 и X. Корреляционный анализ не выявил статистически значимой зависимости количества повреждений от стадии заболевания. У 61 пациента обнаружены неклональные повреждения. При анализе суммарного числа aberrаций (клональных и неклональных) более часто разрывы встречаются в хромосомах 2, 3, 4, 6, 11 и 12. Распределение хромосомных повреждений в настоящей работе отличается от описанных в литературе, что, вероятно, связано с местом проживания описанных популяций.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, лимфоциты периферической крови, клональные и неклональные хромосомные повреждения, стадия заболевания.

Kolubaeva S. N., Novitsky A. V., Myakoshina L. V., Illyin N. V., Vinogradova J. N., Evtushenko V. I., Viktorova N. A., Krasnova O. R., Titova A. A. Cytogenetic investigation of peripheral blood lymphocytes in Hodgkin's lymphomas // Med. Acad. Journ. 2009. Vol. 9. № 3. P. 47–51. S. M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg; Central Research Institute of Rontgenology and Radiology, St. Petersburg.

Chromosomal injuries in 84 patients with Hodgkin's lymphoma were investigated by differential painting. Clonal aberrations were found in 22 patients and 61 patients had various nonclonal aberrations. Comparison of discovered injuries with the injuries published by others shows that the character of injuries and immunological status may depend on geographical regions where the patients live. The most frequent regions of chromosomal injuries were localized in the chromosomes 2, 3, 6, 12, X.

Key words: Hodgkin's lymphoma, chromosomal clonal and nonclonal injuries, stage of illness, peripheral blood lymphocytes.

Лимфома Ходжкина (ЛХ), как полагают в настоящее время, представляет собой малигнизацию лимфоидных клеток, которые происходят из В-клеток зародышевых центров лимфатических узлов или их предшественников. Морфологической особенностью этих опухолей являются многоядерные гигантские клетки Рид-Штернберга, составляющие около 1% клеточной популяции [10].

Классификация ВОЗ различает 5 морфологических типов ЛХ. Наиболее частым является нодулярный склероз – около 75% всех случаев, смешанно-клеточный вариант – 25% и на лимфоидное истощение, лимфоидное преобладание и вариант с большим количеством лимфоцитов (нодулярно-лимфоцитарное преобладание) вместе приходится не более 5%. Необходимо отметить, что процентное соотношение гистологических типов может меняться в зависимости от социального статуса пациента, а также уровня

экономического развития страны, в которой он проживает. По-видимому, с этими факторами связан и иммунологический статус пациентов [8].

По данным авторов из США и Европы, в 50% случаев ЛХ выявлен вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ). Как правило, более высокий уровень ВЭБ выявляется в смешанно-клеточном варианте (до 60–70%), более низкий – при нодулярном склерозе (около 15–30%). Кроме того, установлено, что у пациентов высокого социально-экономического статуса ВЭБ практически не выявляется, однако он высокий у детей и у ВИЧ-инфицированных пациентов (до 80%) [10].

Показано, что тип лимфом, который развивается у ВИЧ-инфицированных пациентов, зависит от степени иммуносупрессии: с близким к норме содержанием CD4 развиваются, как правило, ЛХ; с уменьшением содержания CD4 развивается лимфома Беркитта или иммунобластная лимфома.

В некоторых случаях вызывают затруднения различия между ЛХ и В-клеточными неходжкинскими лимфомами, несмотря на достигнутые успехи в области иммуногистохимии и молекулярной биологии [9].

Для морфологического, генетического и цитогенетического анализов при ЛХ используются клетки лимфатических узлов. Однако в ряде случаев наблюдается увеличение только шейных или подключичных лимфоузлов, которое можно охарактеризовать как реакцию на некоторые виды воспалений. В таких случаях экстирпация лимфоузлов не желательна. В настоящее время установлено, что клетки лимфом уже на ранних стадиях развития диссеминируются в периферическую кровь [2], поэтому могут использоваться для цитогенетического исследования.

При кариотипировании ЛХ найдены цитогенетические аномалии во всех морфологических типах, однако случаев с клональными повреждениями выявлено в 10 раз меньше, чем при неходжкинских лимфомах [9, 11, 3]. Кроме того, в ряде случаев выявлена внутриклональная вариабельность, включая хромосомную нестабильность. Наиболее часто встречаются структурные повреждения хромосомы 1 (делеции, транслокации, дубликации, изохромосомы 1q), они составляют около трети всех цитогенетических аномалий. Различные перестройки в локусе 14q составляют 20% всех случаев, при этом наиболее часто в этом локусе выявляется дополнительный материал. Кроме перечисленных, достаточно часто встречаются различные варианты делеций в плече 6q (15%). Более часто, чем при НЛ, выявляются повреждения в 3q, 7q и 12q, как правило, в виде делеций, а в локусе 13p – в виде дополнительного материала. Наиболее часто встречаемые нарушения числа хромосом, в основном в виде трисомий, – 1, 3, 7, 8 и 21.

Цель настоящей работы – кариотипирование лимфоцитов периферической крови у больных с лимфомой Ходжкина для сравнения их распределения, описанного в литературе, и дальнейшего использования результатов для прогнозирования течения заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитогенетическое исследование проводили у 84 пациентов (26 женщин и 58 мужчин) с различными типами ЛХ, которые находились на лечении в клинике факультетской терапии ВМА и РНЦ РХТ, при этом цитогенетическое исследование было проведено в 102 случаях (у ряда пациентов параллельно исследовали костный мозг и периферическую кровь).

Средний возраст женщин составил 28 ± 3 , мужчин – 34 ± 2 года.

Для цитогенетического исследования использовали периферическую кровь и костный мозг. Забор крови производили при венопункции в пластиковые пробирки с гепарином в концентрации 10–20 ед/мл крови. Костный мозг получали при стерильной пункции в пробирку со специальной средой для костного мозга. Культивирование осуществляли в смеси, состоящей из 80% питательной среды RPMI-1640 и 20% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина, 0,1 мл митогенов. За 2 ч до фиксации в культуральную среду добавляли колхицин в дозе 0,004 мкг/мл («Merck», Германия). Периферическую кровь в количестве 1 мл добавляли в пробирку с ППС и культивировали в течение 72 ч при температуре 37°C 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). Фиксацию метанолуксусной кислотой осуществляли по общепринятой методике. Дифференциальную окраску хромосом выполняли по принятой в лаборатории методике [2, 1]. Анализ повреждений проводили в соответствии с номенклатурой [5]. Статистическую обработку осуществляли, используя методы статистики, с оценкой значимости различий показателей с помощью t-критерия Стьюдента, дисперсионный и корреляционный анализ, программы Microsoft Excel 7,0 и пакет прикладных программ «Statistica 6.0 for Windows».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из обследованных 84 пациентов у 22 (26%) выявлены клональные повреждения, причем они обнаруживаются только при одном типе ЛГМ – нодулярном склерозе. Необходимо отметить, что этот тип наблюдался у 80% всех обследованных пациентов, у 10% выявлен смешанно-клеточный тип и 10% составили остальные варианты.

Из данных, представленных в таблице, следует, что наиболее часто встречались структурные изменения в хромосомах 2, 14 и X. Изменение числа хромосом выявлено только у 3 пациентов, у 2 из них наблюдалась трисомия по хромосоме X, у 1 – трисомия по хромосоме 20. Что касается полиплоидных клеток, то количество их на порядок превышало норму у всех исследованных пациентов, при этом 20% полиплоидных метафаз содержали множественные aberrации, что подтверждает данные [4]. Возможно, такие клетки могут иметь значение в развитии вторичных лейкозов, вызванных воздействием класто-

Клональные повреждения, выявленные в стимулированных митогенами лимфоцитах периферической крови пациентов с болезнью Ходжкина

№ п/п	Число проанализированных клеток	Кариотип поврежденных клеток	Количество клональных повреждений
1	84	46,XY,del 3p25	2
2	70	46,XY,del 2p11	2
3	30	46,XY,del 6q25 46,XY,t(3;17)(q25;p13)	2 2
4	100	46,XY, inv 9p12q21 46,XY,inv 9p12q21, der 14	100 2
5	24	46,XX,del 12p13	2
6	62	46,XY,del 1q	2
7	30	46,XX,derX 46,XX,del 17q23	2 2
8	228	46,XX,del 14q32 46,XX,del 12p13 46,XX,del Xq24 47,XX,+X	2 4 3 3
9	100	46,XY, del 8p22-23	2
10	84	46,XY,del3p25	2
11	40	47,XY,+20	2
12	90	46,XX,del 3p25	2
13	70	46,XY,del 2p11	2
14	50	46,XX,der 11	2
15	30	46,XY,del 6q25 46,XY,t(3;17)(q25;p13)	2 2
16	61	46,XY,del 14q32	2
17	64	46,XY,del 14q32	2
18	80	46,XY,del 2q22	3
19	24	46,XX,del 12p 13	2
20	62	46,XY,del1q10	2
21	30	46,XY,derX	2
22	228	46,XX,del12p13 Xq2446,XX,del 47,XX,+X	4 3 3

генных факторов в виде химиотерапевтического или лучевого лечения [6].

При сравнении полученных результатов с данными работ, в которых исследовали в основном пациентов из США и Европы, еще раз становится очевидным, что характер повреждений в хромосомах зависит от страны проживания исследованной популяции. Так, наиболее часто выявляемые в США повреждения в 1-й хромосоме составляют треть всех повреждений, в настоящей работе они обнаружены только в 9,1% случаев. В то же время очень редко встречающиеся повреждения во 2-й хромосоме, по данным литературы, у пациентов клиники встречаются в 13,6% случаев. Наличие трисомии по X-хромосоме в литературе описано при НЛ, в частности

при хроническом лимфоцитарном лейкозе, как вторичное, дополнительное нарушение. Необходимо отметить, что у больных с ЛХ трисомия по хромосоме X также встречается, скорее всего, как дополнительное нарушение. Так, при клональном нарушении 46,XX,del 12p13 наличие трисомии по X-хромосоме отмечено дважды (таблица, № 8 и 22). У 2 пациентов выявлена клональная транслокация между 3-й и 17-й хромосомами, при этом вовлекаемый в транслокацию локус 3q25 отмечается многими авторами при ЛХ и при всех лимфопролиферативных заболеваниях и считается индикатором агрессивного клинического течения заболевания [7].

На рис. 1 представлена частота разрывов в различных хромосомах при клональных нарушениях.

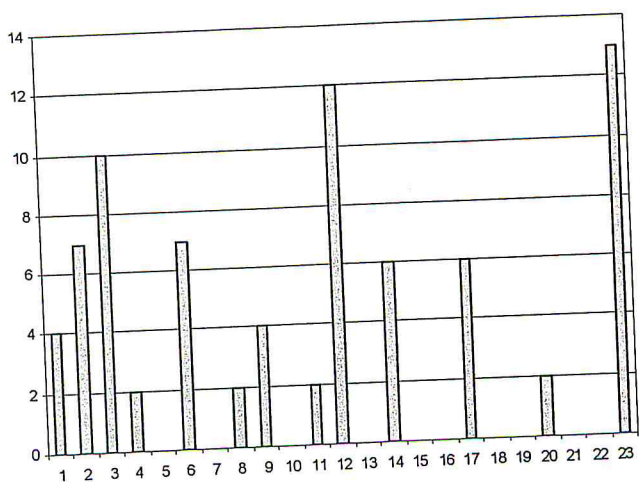


Рис. 1. Частота повреждаемости хромосом при анализе клональных нарушений.

По оси абсцисс – номера хромосом (23 соответствует хромосоме X), по оси ординат – количество повреждений в хромосомах, абсолютное значение

Очевидно, что наибольшее количество разрывов наблюдается в хромосомах 3, 12 и X, что в общей сложности составляет около 45,5%. Хромосомы 2, 6, 14 и 17 вовлекаются в повреждения приблизительно с равной частотой, которая в сумме составляет 33,8% общего числа клональных разрывов.

Что касается нарушений неклонального характера, то они выявлены у 61 пациента и составили около 73% исследованного числа пациентов.

На рис. 2 представлена суммарная частота повреждений в хромосомах при клональных и неклональных нарушениях. Корреляционный анализ не выявил зависимости суммарного числа повреждений от стадии заболевания, более того, самый высокий уровень повреждений (50%) наблюдался при II, а

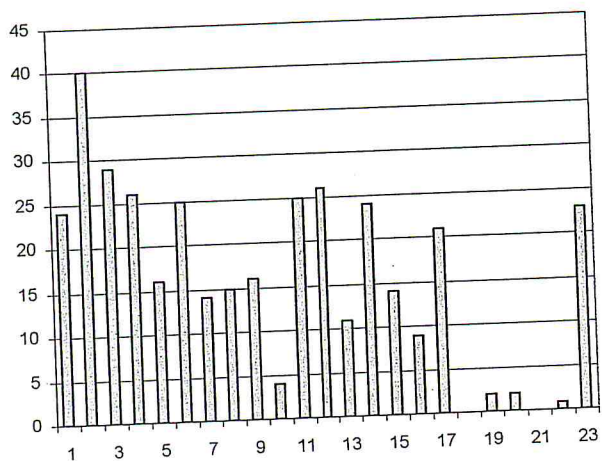


Рис. 2. Суммарная частота повреждаемости хромосом при клональных и неклональных нарушениях.

По оси абсцисс – номера хромосом (23 соответствует хромосоме X), по оси ординат – количество повреждений в хромосомах, абсолютное значение

самый низкий – при IV стадии заболевания. Кроме того, 19% всех обследованных пациентов не имели никаких видимых нарушений. Эти данные свидетельствуют о том, что в ряде случаев развитие БХ происходит без повышения уровня нестабильности хромосом.

Средний уровень повреждений у обследованных нами пациентов составил $9,1 \pm 0,84\%$, что превышает данные, приведенные в работе [4]. По-видимому, метод дифференциальной окраски хромосом, использованный в нашей работе, позволяет выявить более широкий спектр повреждений по сравнению с рутинной окраской.

Наиболее часто разрывы наблюдались в хромосомах 2, 3, 4, 6, 11, 12 и 14, на долю которых пришлось 195 разрывов, что в общей сложности составило 50,5% общего числа всех повреждений. Это подтверждает гипотезу, которая возникла для объяснения частоты разрывов в хромосомах при воздействии ионизирующей радиации: количество повреждений в хромосоме зависит не от длины хромосомы, а от активности генов, расположенных в ней. Не исключено, что это правило действует не только при облучении, но и при любом повреждающем воздействии, в том числе и при воздействии вирусов, значение которых в патогенезе ЛХ, несмотря на существенные достижения в этой области, до сих пор однозначно не определено. Так как количество пациентов с ЛХ, как и количество пациентов ЛХ с вирусом Эпштейна-Барра, варьирует в различных популяциях, то его присутствие может быть объяснением увеличения частоты этого заболевания в популяции.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Увеличение уровня генетической нестабильности в лимфоидных клетках не является обязательным условием для развития лимфомы Ходжкина.
2. Характер хромосомных повреждений зависит от места проживания пациентов с ЛХ, т. е. носит географический характер.
3. Наибольшее количество клональных нарушений выявлено в хромосомах 3, 12 и X.

Литература

1. Богданов А.Н., Саржевский В.О., Колобаева С.Н. и др. Цитогенетическое исследование злокачественных лимфом // Вестник СПб университета. 2008. Серия 11. № 3. С. 126–131.
2. Колобаева С.Н., Саржевский В.О., Титова А.А. и др. Цитогенетическая характеристика больных с хроническим лимфоцитарным лейкозом // Мед. акад. журн. 2006. Т. 6. №3. С. 109–114.
3. Новик А.А. Классификация злокачественных лимфом. СПб.: Элби, 2000. 126 с.

4. Рябченко Н.И., Насонова В.А., Фесенко У.И. и др. Анализ хромосомных повреждений в лимфоцитах пациентов с лимфомой Ходжкина после химиотерапии и радиационной терапии // Радиц. биол. радиоэкол. 2008. Т. 48. № 2. С. 146–152.
5. An international system for human cytogenetic nomenclature / Ed. L.G. Shaffer, N. Tommerup. 2005. 130 p.
6. Brusa G., Zuffa E., Hattinger C.M. et al. Genomic imbalances associated with secondary acute leukemias in Hodgkin lymphoma // Oncol. Rep. 2007. Vol. 18. № 6. P. 1427–1434.
7. Cady F.M., O'Neil B.P., Law M.E. Del (6)(g22) and BCL6 rearrangement in primary CNS lymphoma are indicators of an aggressive clinical course // J. Clin. Oncol. 2008. Vol. 26. № 29. P. 4814–4819.
8. Harris N.L. The many faces of Hodgkin's disease around the world: What have we learned from its pathology? // Ann. of Oncology. 1998. Vol. 5. P. 45–56.
9. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001.
10. Rudiger T., Jaffe E.S., Delsol G. et al. Workshop report on Hodgkin's disease and related diseases («grey zone» lymphoma) // Ann. of Oncology. 1998. Vol. 5. P. 31–38.
11. The Principles of Clinical Cytogenetics / Gersen S.L., Keagle M. B., ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1999. 558 p.

Представлена академиком РАМН А. Н. Климовым