

ФЕНОМЕН ЭВОЛЮЦИИ КЛОНАЛЬНЫХ ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ В ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ



Проведен анализ хромосомных аномалий клеток костного мозга при постановке диагноза острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) у 116 детей. Частота эволюции клональных аномалий хромосом при ОМЛ составила 42,3 %. Наиболее часто встречались количественные аномалии хромосом 8, 9 и 21, вторичные структурные – в дисках хромосом 12p12, 9p22, 9q22, 9q34, 11q14–23, 16q22. Количественные аномалии фиксировали в 26,7 % случаев. Основным механизмом эволюции опухолевого клона было появление трисомии, делеции и моносомии. Эволюция встречалась в 7 раз чаще в возрастной группе до двух лет и в 2 раза чаще – в группе до пяти лет. Выявлена высокая частота эволюции при $t(15;17)(q22;q22)$ и полное ее отсутствие при $inv(16)(p13q22)$. У пациентов с эволюцией лейкоэмического клона в два раза чаще регистрировали более высокую частоту рецидивов и раннюю смерть до достижения ремиссии, что может соответствовать более тяжелому инициальному статусу этих пациентов. Предложена концепция эволюции аномального клона в несколько этапов: I – появление сбалансированной перестройки, II – появление трисомии, III – потеря генетического материала. Появление несбалансированности генома в результате эволюции может давать преимущества в пролиферации клона и быть связана с ответом на химиотерапию. В результате сопоставления кариотипов на момент постановки диагноза и в рецидиве заболевания выявлена идентичность структуры аномалий хромосом, что может свидетельствовать об инициальном индуцировании химическими агентами некоторых типов эволюции лейкоэмических клеток при ОМЛ у детей.

Введение. Эволюция опухолевого клона – известный феномен при неоплазиях, особенно при солидных опухолях [1, 2]. В литературе рассматривается связь эволюции лейкоэмического клона с прогрессией заболевания при хроническом миелоидном лейкозе (ХМЛ) [3, 4], при вторичном миелодиспластическом синдроме, остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) [5] или остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) [6]. Несмотря на то, что хромосомные аномалии в опухолевых клонах при неоплазиях интенсивно изучаются уже более 20 лет, клональная эволюция недостаточно исследована в силу методических ограничений, связанных со сниженным количеством делящихся клеток, что обусловлено химиотерапией (ХТ).

При ОМЛ рассматриваются две группы эволюции лейкоэмических клеток: первую группу составляют случаи, когда при постановке первичного диагноза выявляется более одной хромосомной перестройки, ко второй группе относят случаи, при которых кариотипические аномалии, выявленные на момент постановки диагноза, отличаются от таковых при рецидиве заболевания [7–9]. При постановке диагноза хромосомные aberrации по времени возникновения также делят на первичные и вторичные. Первичные хромосомные aberrации часто выявляются как одиночные кариотипические аномалии, которые специфично ассоциированы с одним из типов ОМЛ и, предположительно, играют существенную роль на ранних стадиях лейкозогенеза. Такие первичные aberrации часто регистрируются как сбалансированные перестройки, в виде реципрокных транслокаций, инверсий, инсерций [10, 11]. Вторичные хромосомные аномалии, согласно данным литературы, встречаются самостоятельно очень редко и, вероятно, играют важную роль в прогрессии заболевания. Они менее специфичны, чем первичные перестройки, и выявляются в виде несбалансированной транслокации, трисомии, моносомии, делеции, изохромосомы и дупликации [12, 13]. Таким образом, эволюцию клона по структуре можно разделить на две категории. К первой категории относятся случаи одновременного присутствия в опухолевом клоне нескольких структурных перестроек [14, 15], ко второй категории – одновременное присутствие структурных и дополнительных количественных перестроек

[16–18]. Частота таких сложных кариотипов составляет 13,8 % [19].

Появление околотетраплоидных клонов описано при всех подтипах ОМЛ у взрослых пациентов. Как правило, удваиваются клоны со структурными и числовыми аномалиями. Авторы связывают это с эндоредупликацией или эндомитозом исходного аномального клона [20]. Прогностическое значение этого явления окончательно не установлено. Согласно данным одних авторов, выявление околотетраплоидии с удвоенной структурной перестройкой $t(15;17)$ при постановке диагноза не ухудшило прогноз течения заболевания [21], по данным других, наоборот, аномалия привела к мультилекарственной резистентности и смерти [22]. Исследования показали, что появление околотетраплоидных клонов является вторичным событием [23, 24] и, как правило, регистрируется при рецидиве заболевания [25, 26]. Причины возникновения эволюции опухолевого клона, приводящие к несбалансированности генома при постановке диагноза, и ее клиническое значение — не известны.

Целью исследования явилось изучение феномена эволюции лейкомиического клона при постановке диагноза, а также в рецидиве заболевания при ОМЛ у детей.

Материалы и методы. Цитогенетические исследования проводили в отделении проблем гематологии детского возраста ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины». В работу включены случаи ОМЛ, зарегистрированные в течение 1992–1996 и 2003–2008 гг. Анализ кариотипа осуществляли в лейкомиических клетках костного мозга на момент постановки диагноза у 116 пациентов, при рецидиве заболевания — у 9. В числе обследованных — 66 мальчиков и 55 девочек в возрасте от 4 мес до 18 лет. В анализе клинического значения феномена эволюции лейкомиического клона учитывали пол, возраст пациентов, тип опухоли по классификации ВОЗ [27], инициальное количество лейкоцитов, число бластных клеток в костном мозге (КМ) и периферической крови (ПК), наличие экстрамедуллярных очагов поражения, а также распределение пациентов по клиническим группам риска в соответствии с концепцией немецкой онкологической группы «AML-BFM», наличие обусловленных болезнью

событий после постановки диагноза (рецидив, ранняя смерть, смерть в ремиссии, смерть от инфекционно-токсических осложнений, отказ от терапии) и определение статистического показателя пятилетнего бессобытийного выживания по Каплан-Мейер.

Цитогенетические исследования проводили на краткосрочной культуре (24-часовой) лейкомиических клеток костного мозга в питательной среде RPMI-1640 с 20%-ной эмбриональной телячьей сывороткой, пенициллином и стрептомицином. Препараты метафазных хромосом готовили по общепринятой методике, окрашивали — по GTG-методике [28]. Хромосомные аномалии описывали согласно ISCN 2005 [29]. Наличие хромосомных аномалий в лейкомиическом клоне регистрировали по общепринятым правилам, когда две или более метафазных клеток имели идентичные аномалии или дополнительные хромосомы и когда три или более метафазных клеток имели идентичные моносомии.

Результаты исследований анализировали с помощью программ «STATISTICA» (версия 6.0), «EXCEL».

Результаты исследований и их обсуждение. При оценке клональной эволюции кариотипов лейкомиической популяции на момент постановки диагноза пациенты были разделены на две группы: без эволюции (I) и с наличием феномена эволюции лейкомиического клона (II). Первую группу составили 67 случаев без эволюции лейкомиического клона ($n = 67$; 57,7 %). Инициально вторичные изменения или присутствие всех видимых этапов эволюции кариотипа были выявлены в 49 случаях (42,3 %), т.е. почти в половине наших наблюдений. Это более чем в два раза чаще, чем описано в литературе [19]. Частота регистрации эволюции при ОМЛ согласно нашим наблюдениям [30] оказалась значительно выше, чем при ОЛЛ (27,9 %). Следует отметить, что перестройки $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-22)$, $t(9;22)(q34;q11)$, $t(8;16)(p11;p13)$, $del(16)(q22)$, последние три из которых ассоциированы в прогнозе с неблагоприятным течением ОМЛ, встречались в обеих группах пациентов.

Сопоставление основных клинико-лабораторных характеристик в соответствии с исследуемыми цитогенетическими группами пред-

Таблица 1

Клинико-гематологические показатели пациентов с наличием и без клональной эволюции лейкоэмического клона на момент постановки диагноза ОМЛ в детском возрасте

Клинико-лабораторные параметры	Клональные хромосомные аномалии, <i>n</i> (%)	
	без эволюции, <i>n</i> = 68	с эволюцией <i>n</i> = 49
Девочки : мальчики	28 : 39	24 : 25
Возраст		
до 5 лет (до 2 лет включительно)	12 (2)	16 (10)
от 5 до 10 лет	19	9
от 10 до 15 лет	19	16
старше 15 лет	17	8
средние значения	10,5 ± 0,4	8,8 ± 0,6
Увеличение печени более 5 см	21 (31,3)	24 (48,9)
Увеличение селезенки	20 (29,8)	19 (38,8)
Инициальное поражение ЦНС	9 (13,4)	5 (10,2)
Геморрагический синдром	26 (38,8)	2 (4,1)
ВОЗ классификация		
ОМЛ с t(8;21)(q22;q22)	5 (7,5)	4 (8,2)
ОМЛ с t(15;17)(q22;q11-22)	4 (5,9)	9 (18,4)
ОМЛ с inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	7 (10,4)	0
ОМЛ с аномалиями 11q23	5 (7,5)	5 (10,2)
ОМЛ с мультилинейной дисплазией без предшествующего миелодиспластического синдрома	2 (3,0)	1 (2,0)
ОМЛ, связанные с предшествующей терапией	7 (10,4)	2 (4,1)
ОМЛ без признаков созревания	0	1 (2,0)
ОМЛ с минимальной дифференцировкой	6 (8,9)	5 (10,2)
ОМЛ с признаками созревания	7 (10,4)	4 (8,2)
острый промиелоцитарный лейкоз	1 (1,5)	2 (4,1)
острый миеломоноцитарный лейкоз	8 (11,9)	7 (14,3)
острый моноцитарный лейкоз	9 (13,4)	3 (6,1)
острый эритролейкоз	1 (1,5)	3 (6,1)
острый мегакариоцитарный лейкоз	1 (1,5)	1 (2,0)
острый гибридный лейкоз	4 (6,0)	4 (8,2)
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	36,3 ± 3,1	48,2 ± 3,3
Гемоглобин, г/л	83,8 ± 7,5	78,7 ± 6,9
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	77,5 ± 6,9	67,9 ± 5,8
Количество бластных клеток в КМ	32,8 ± 2,9	38,9 ± 2,6
Количество бластных клеток в ПК	61,8 ± 4,7	64,8 ± 5,9
Клинические события	<i>n</i> = 63	<i>n</i> = 45
ранняя смерть (до достижения ремиссии)	5 (7,9)	9 (20,0)
нечувствительность к терапии	4 (6,3)	3 (6,7)
рецидив	7 (11,1)	9 (20,0)
ранний рецидив	2 (28,6)	4 (44,4)
поздний рецидив	5 (71,4)	5 (55,6)
смерть в полной ремиссии	7 (11,1)	2 (4,5)
общие неудачи терапии	23 (36,5)	25(51,1)

ставлено в табл. 1, из которой видно, что в группе без эволюции клона было больше мальчиков, чем девочек (39 и 28 соответственно).

Распределение по возрастным группам показало, что в младшей возрастной группе, до двух лет, почти в 7 раз чаще регистрировали эволю-

Таблица 2
Различные типы эволюции лейкомиического клона при постановке диагноза ОМЛ в детском возрасте

№ п.п.	Тип эволюции	Количество пациентов
1	t(A;B), t(C;D)	1
2	t(A;B), del(C)	11
3	t(A;B) или инверсия, дополнительные числовые аномалии	14
4	del(A), дополнительные структурные аномалии	11
5	del(A), дополнительные числовые аномалии	8
6	-A,+B	1
7	Удвоение числовых и структурных аномалий в полиплоидных клонах	4

цию клональных аномалий — 10 случаев (20,4 %) против 2 (3,0 %) в группе без эволюции, и почти в 2 раза чаще в группе до пяти лет — 16 случаев (32,6 %) против 12 (17,9 %). Это важное наблюдение, так как с позиции изучения прогностического значения феномена эволюции выявляется определенное соответствие с прогностической оценкой возрастного фактора в группе младше двух лет и в группе от двух до шести лет. Частота экстрамедулярных поражений при постановке диагноза практически не отличалась в исследуемых группах, в то время как в группе без эволюции чаще регистрировали геморрагический синдром (38,8 % против 4,1 % — с наличием эволюции). Современная классификация ВОЗ впервые выделяет типы ОМЛ, связанные с определенными аномалиями хромосом [27], причем независимо от морфологических вариантов по ФАБ-классификации (франко-американско-британская). В связи с этим привлекает внимание в нашем исследовании высокая частота появления эволюции хромосомных аномалий именно с транслокацией t(15;17)(q22;q22), что составило 18,4 % по сравнению с 5,9 % в группе без эволюции, а также отсутствие эволюции при инверсии inv(16)(p13q22). Несмотря на то, что в группе с эволюцией инициальный уровень лейкоцитов в ПК был достоверно выше (48,2 % против 36,3 %, $P < 0,01$), по содержанию гемоглобина, тромбоцитов, про-

центному содержанию бластных клеток в КМ и ПК не выявлено достоверных отличий. Каких-либо предпочтений в спектре ФАБ-морфологических типов ОМЛ (от M0 до M7) выявить не удалось. В прогностических аспектах обращает на себя внимание факт выявления в 2,5 раза чаще в группе с эволюцией клона случаев ранней смерти до достижения ремиссии. Однако эти случаи наиболее часто были связаны с инфекционно-геморрагическими осложнениями, что может косвенно соответствовать более тяжелому инициальному статусу этих пациентов (например, гиперлейкоцитоз с тромбогеморрагическим синдромом, тромбоцитопения, сепсис на первом этапе ХТ). Особенно важно, что значительные отличия определялись в отношении частоты рецидивов — 20,0 % наблюдений с эволюцией клона по сравнению с 11,1 % у остальных пациентов. К тому же при эволюции клона чаще всего случались ранние рецидивы заболевания (44,4 % против 28,6 %) и чаще регистрировались неудачи ХТ (51,1 % против 36,5 %). Однако относительно первичной рефрактерности к ХТ отличий не было выявлено.

Особый клинический интерес представляют результаты анализа уровня пятилетнего бессобытийного выживания пациентов с ОМЛ — при регистрации эволюции лейкомиического клона коэффициент был на 15 % ниже, чем в группе без эволюции клона (0,46 и 0,31 соответственно) (рис. 1). Предположительно связываем эти результаты с тем, что в наших исследованиях отмечается высокая частота потери генетического материала как в виде моносомий и делеций, так и увеличения генома за счет трисомий и дупликаций.

Схематическое обобщение типов эволюции аномального клона представлено в табл. 2. Как видно из полученных данных, практически все случаи эволюции (42 из 49) представлены несбалансированным геномом, т.е. связаны с потерей или увеличением генетического материала в виде делеции, трисомии, моносомии и дупликации.

Научный интерес в понимании биологического значения феномена эволюции представляет анализ частоты вовлечения различных хромосом в количественные перестройки (рис. 2).

Моносомии встречались достаточно часто, практически в 11 случаях (22,4 %): так, по од-

ному наблюдению выявляли моносомии по хромосомам 1, 2, 5, 8, 15, 16, 21 и четыре – по половой X-хромосоме.

Согласно данным литературы, явление гипердиплоидии, особенно высокой (больше 50 хромосом), более характерно для ОЛЛ, при котором оно встречается в 25–30 % случаев [31, 32], и редко наблюдается при ОМЛ [33]. В наших же исследованиях частота гипердиплоидии при ОМЛ в группе с наличием эволюции составила 21 случай (42,9 %), при этом 47–50 хромосом регистрировали в 19 случаях (38,8 %), а более 50 хромосом – в 2 случаях (4,1 %). По всей группе с ОМЛ частота гипердиплоидии составила 18,1 %. Эти результаты могут свидетельствовать о сходных механизмах лейкозогенеза как при ОЛЛ, так и при ОМЛ в детском возрасте. В образовании трисомий принимали участие хромосомы 2, 5, 7, 10, 14, 15, 22 и X-хромосома (по одному случаю), хромосомы 4, 6, 16, 20 (по 2 случая), хромосомы 11, 18, 19, 21 (по 3 случая), 8, 9 (по 4 случая) и маркерные хромосомы (5 наблюдений).

Таким образом, наиболее активно в количественные перестройки вовлекались хромосомы 8 (5 случаев), 9 и 21 (по 4 случая). Кроме того, в пяти наблюдениях была выявлена дополнительная маркерная хромосома. Согласно данным российских исследователей [18] при ОМЛ в детском возрасте частота количественных аномалий составляет 5,7 %. В наших исследованиях частота количественных аномалий хромосом в виде моносомий и трисомий была значительно выше и составила 31 случай (26,7 %), т.е. более чем в 4 раза чаще, чем описано в литературных источниках.

Анализ типов структурных перестроек показал, что наиболее часто встречалась дистальная делеция и перестройка в виде реципрокной транслокации (33 и 30 случаев соответственно), а также дериватные хромосомы (4 случая) (рис. 3). Наиболее часто в структурные перестройки вовлекались хромосомы 17 (13 случаев, в основном в виде транслокации), 8 и 9 (по 12 случаев, из них по 7 – транслокации), 11 (11 случаев, из них 6 транслокаций и 5 делеций), 15 (10 транслокаций), 12 (7 делеций короткого плеча), 16 (7, из них 5 делеций и 2 транслокации) и 13 (6 транслокаций). Обобщение этих данных показало, что вторичные

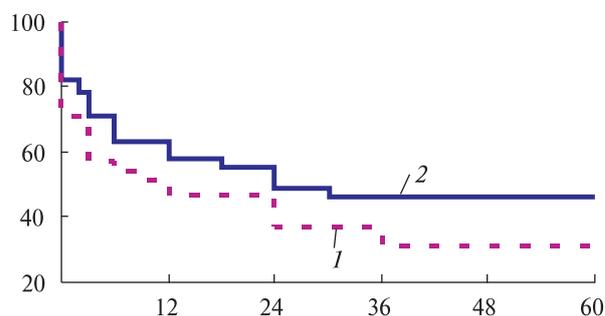


Рис. 1. Динамика пятилетнего бессобытийного выживания пациентов с наличием (1) и без эволюции (2) лейкоэмического клона на момент постановки диагноза ОМЛ: по вертикали – %, по горизонтали – месяцы

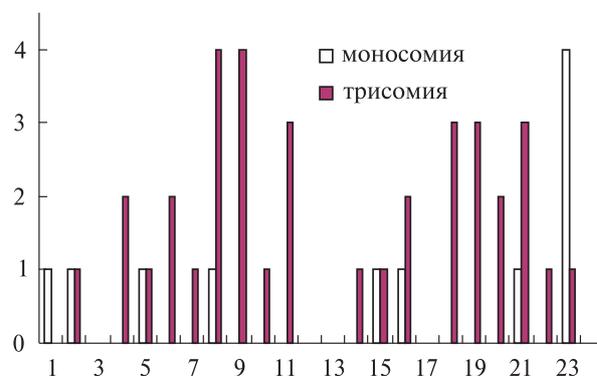


Рис. 2. Частота вовлечения хромосом в числовые перестройки во время эволюции лейкоэмического клона при постановке диагноза ОМЛ в детском возрасте: по вертикали – случаи, по горизонтали – хромосомы

структурные аномалии в клонах со структурными перестройками распределились следующим образом:

- с транслокацией $t(8;21)(q22;q22)$ были выявлены числовые и структурные аномалии хромосом – потеря половой хромосомы X, Y, трисомия хромосом 5, 10, 22, $del(9)(q22)$;
- с $t(15;17)(q22;q11)$ – трисомия хромосом 8, 9, 11, 22, дополнительная маркерная хромосома, моносомия хромосомы 16, $del(9)(q34)$, $del(12)(p12)$ (2 случая), $t(17;20)(q22;p13)$;
- с аномалиями в диске $11q23$ – трисомия хромосом 9, 19, дополнительная маркерная хромосома, высокая гипердиплоидия, $del(16)(q22)$, $del(21)(q13)$.

Суммарно вторичные структурные аномалии чаще встречались в коротком плече хромосомы 12 (7 случаев), длинном плече хро-

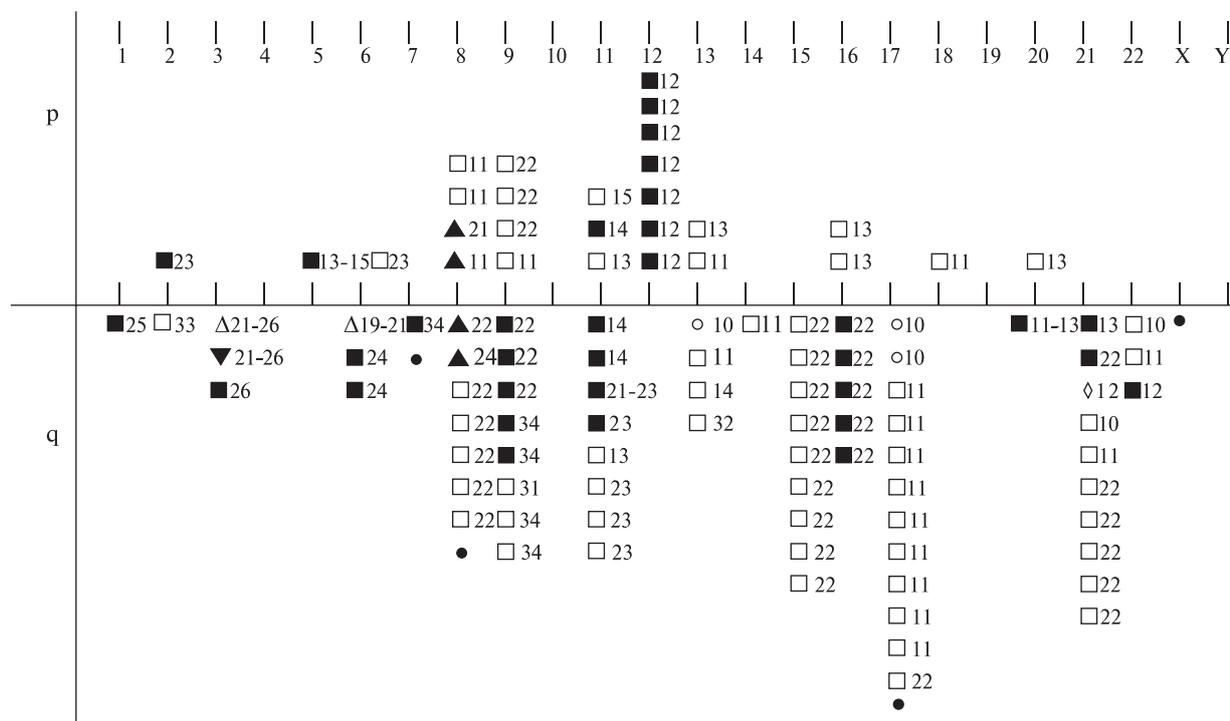


Рис. 3. Распределение различных типов перестроек при клональной эволюции лейкозного клона при ОМЛ в детском возрасте: ■ – делеция; □ – транслокация; ○ – изохромосома; ▲ – перичентричная инверсия; △ – парацентричная инверсия; ▼ – дупликация; ● – дериватная хромосома; ◇ – дополнительный материал неизвестного происхождения; p – короткое плечо, q – длинное плечо

сомы 9, в коротком и длинном плечах хромосомы 11, длинном плече хромосомы 16 (по 5 случаев соответственно). Кроме того, к появлению несбалансированности генома аномальных гемопоэтических клеток, т.е. ко вторичным событиям привлекались хромосомы 1, 2, 3, 5, 6, 20–22. В то же время анализ результатов показал, что в количественные аномалии не вовлекались хромосомы 3, 12, 13, 17, а в структурные перестройки – хромосомы 4, 10, 19 и Y.

С позиций лейкозогенеза при оценке этапности клональной эволюции кариотипов на момент постановки диагноза научный интерес представляют 14 наблюдений, в которых зарегистрировано сочетанное присутствие нескольких этапов эволюции с количественной или структурной перестройкой. Приводим описание этих кариотипов:

- 1) 46,XY,t(2;11)(q33;p13)[4]/46,idem,del(16)(q22)[3]/4n±[2];
- 2) 47,XY,+9[3]/47,idem,del(11)(q21q23)[5]/46,XY[5];

- 3) 47,XY,+21[3]/47,idem,del(12)(p12)[2]/46,XY[3];
- 4) 46,XY,dup(3)(q21q26)[6]/46,idem,del(9)(q22)[3]/4n±[5]/46,XY[14];
- 5) 46,XX,t(11;14)(q13;q11)[2]/46,idem,del(1)(q25)13]/4n±[6];
- 6) 46,XY,t(13;13)(p11;p13)[18]/46,sl,del(6)(q24)[3]/47,sdl,+mar [4]/4n±[4];
- 7) 46,XY,t(9;13)(p11;q11),del(12)(p12)[12]/46,idem,del(11)(p14),del(21)(q22)[2]/4n±[4];
- 8) 47,XX,inv(8)(p11q22),+11,der(17)[17]/48,idem,+7[2]/4n±[5]/46,XX [2];
- 9) 46,XY,t(6;9)(p23;q34)[10]/47, idem,+20[2];
- 10) 46,XY,del(11)(q14)[7]/46,sl,(12)(p12)[8]/46,sdl,del(9)(q34)[4];
- 11) 46,XX,t(21;22)(q10;q10)×2[17];
- 12) 46,XY,t(9;21)(q31;q11),der(8),der(14)[8]/92, idem×2[3]/46,XY[4];
- 13) 46,XX,del(16)(q22)[7]/4n±,del(16)(q22)×2[6]/46,XX[7];
- 14) 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[5]/4n±,t(9;22) (q34;q11)×2[5]/46,XY[8].

Анализ выявленных изменений позволяет предположить, что сбалансированные структурные перестройки появляются на первом этапе лейкозогенеза, а затем на продвинутом этапе появляются делеции (№ 1, 4–7, 10) или количественные аномалии, в основном трисомии (№ 8, 9).

В случаях появления трисомии на начальных этапах злокачественной трансформации гемопоэтической клетки (№ 2, 3) делеции также появляются на продвинутом этапе. Однако возможно, что и в этих двух случаях первым событием были криптические (скрытые) перестройки [34, 35].

Схематично базовые этапы эволюции с учетом количественных и структурных аномалий можно представить следующим образом:

Сбалансированная
структурная перестройка (ССП) → ССП,
трисомия(и) → ССП, трисомия(и)
и/или моносомия → ССП,
трисомия(и) и/или моносомия, делеция

Существует версия, что для получения преимуществ в пролиферации и увеличения клеточного метаболизма аномальной клетки перед нормальной используется механизм эндоредупликации иногда целого генома, иногда отдельных хромосом, возможно для увеличения дозы необходимых генов [36, 37]. И на последнем этапе аномальная клетка может получить дополнительные преимущества в результате потери целой хромосомы или ее части в виде делеции или возможной инактивации вследствие микроделеции опухолесупрессирующего гена [38, 39].

Нам удалось идентифицировать явление удвоения генетического материала со структурной аномалией хромосом только в четырех наблюдениях (№ 11–14), в то время как нормальный клон не удваивался. В остальных случаях было возможно приблизительно оценить число хромосом в метафазной пластинке. Приведенный феномен не может быть обусловлен полиплоидией в мегакариобластах, так как в исследуемом материале констатировали аплазию мегакариоцитарного роста за счет пролиферации лейкоэмического клона. Возможным механизмом такого удвоения может быть эндоредупликация именно аномального кариотипа.

В литературе описаны случаи удвоения клона со структурной перестройкой в рецидиве заболевания после предшествующей ХТ [25, 26]. Считается, что полиплоидия – результат редукции пролиферативной функции, которая происходит в дифференцированной клетке, уже не обладающей способностью полностью обеспечить одновременное течение пролиферативных и тканеспецифичных синтезов. При этом в клетках, которые полиплоидизируются, пролиферация не блокируется по типу «все или ничего», что свойственно диплоидным популяциям, а характерным является грация в смене хода митоза. Митоз начинается, но не завершается, например не образуется клеточная перегородка, и клетка продолжает жить с двумя ядрами [40]. В подтверждение этого в наших препаратах после культивирования в питательной среде усиливается пролиферативная активность и наблюдаются двухъядерные клетки.

По мнению некоторых ученых [41] одним из механизмов угнетения репродуктивной функции клетки, которое приводит к полиплоидии, является конкуренция разных синтезов в жизнедеятельности клетки, в частности, путем вытеснения пролиферативных синтезов тканеспецифическими.

Таким образом, логично, что геномная изменчивость является результатом реализации программы дифференцировки, в которой тканеспецифичные синтезы вытесняют пролиферативные. Однако лейкоэмические клетки характеризуются блоком дифференцировки и сохраняют ведущим пролиферативный рост. Возможно, в лейкозогенезе тканеспецифические синтезы аномальны за счет неконтролируемой геномом поддержки пролиферативного потенциала.

При рецидиве ОМЛ цитогенетические исследования были проведены в 9 образцах, из них в динамике наблюдения, т.е. при постановке диагноза и рецидиве – в 6 случаях. Феномен эволюции лейкоэмического клона выявлен в 4 случаях (№ 1, 5, 7).

Схематическое обобщение по структуре эволюции аномального клона на момент постановки диагноза и в рецидиве заболевания (табл. 3) позволило установить факт потери числовых аномалий, а также делеции при рецидиве именно в тех случаях, когда при постановке диаг-

Таблица 3
Различные структуры лейкомиического клона при постановке диагноза и рецидиве ОМЛ в детском возрасте

№ п.п	Кариотип/число наблюдений	
	при постановке диагноза	в рецидиве заболевания
1	i(A),del(B)/1	t(C;D), дополнительные числовые аномалии/1
2	del(A), дополнительные числовые аномалии/1	del(B)/1
3	t(A;B)/1	t(B;A)/1
4	inv(A)/1	inv(A)/1
5	—	t(A;B),del(C)/1
6	t(A;B), дополнительные числовые аномалии/3	t(A;B)/3
7	—	t(A;B), дополнительные числовые аномалии/1
8	t(A;B),del(C)/1	t(A;B)/1

Таблица 4
Клональная эволюция при постановке диагноза и элиминация числовых аномалий в рецидиве ОМЛ в детском возрасте

№ п.п	Кариотип	
	при постановке диагноза	в рецидиве заболевания
1	48~56,XX,+2,+4,+5,+6, 46,XX,t(9;11)(p22;q23)[4]/+8,+10,t(9;11)(p22;q23), 4n±[7]/46,XX[13] +18,+19,+21,+mar[cp9]/4n±[5]	46,XX,t(11;14)(q13;q11) 46,XX,t(11;14)(p13;q11)[2]/[2]/46,XX,del(1)(q25),t(11;14)(q13;q11)[13]/4n±[6]
3	48,XY,t(8;21)(q22;q22), +10,+22[7]/4n±[3]	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[2]/48, idem, +10,+22[4]/48, idem,+10,del(15)(q22), +22[2]/4n±[2]/46,XY[5]
4	47,XY,+5,t(8;21)(q22;q22)[11]/46,XY[8]	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[7]/46,XY[5]

ноза в клоне присутствовали числовые и структурные перестройки (3 случая) (№ 6) или две структурные перестройки (сбалансированная транслокация и делеция) (№ 8). На наш взгляд, эти перестройки могут свидетельство-

вать о преимуществе в пролиферации клона с одновременным присутствием структурной и числовой перестройки перед клоном со структурной перестройкой.

Принимая во внимание то, что действие ХТ в основном направлено на удаление делящихся клеток, которые находятся в фазе митоза S/G₂, можно предполагать, что первым элиминируется гипердиплоидный клон. После эрадикации активно делящегося клона его место занял базовый клон с первичной перестройкой (табл. 4). Эти наблюдения могут служить подтверждением рассматриваемой нами этапности лейкозогенеза. Кроме того, было отмечено, что три схематических типа аномалий хромосом на момент установления диагноза и в рецидиве заболевания были схожими (№ 3, 4, 6). Схематическое подобие структуры эволюции клональных хромосомных аномалий и частая потеря генетического материала на момент постановки диагноза, а также после ХТ позволяют предполагать, что в случаях инициального выявления в опухолевом клоне транслокации и дополнительных количественных аномалий или транслокации и делеции в основе возникновения ОМЛ лежит влияние химических агентов на геном гемопоэтических клеток.

Обобщая представленные результаты исследований, можно заключить, что частота встречаемости феномена эволюции лейкомиического клона в наших исследованиях была выше более чем в два раза по сравнению с литературными сведениями и составила 42,3 % случаев с ОМЛ. Среди количественных аномалий наиболее часто встречались перестройки хромосом 8, 9 и 21, среди вторичных структурных — аномалии в коротком плече хромосомы 12, длинном плече хромосом 9, 16, в коротком и длинном плечах хромосомы 11. Количественные аномалии встречались в 4 раза чаще, чем описано в литературе, при этом в количественные аномалии не вовлекалась хромосома 1, в структурные — хромосомы 3, 4, 10, 18, 21 и Y.

Феномен клональной эволюции встречался в 7 раз чаще в возрастной группе до двух лет и в 2 раза чаще в группе до пяти лет. Выявлена высокая частота эволюции при t(15;17)(q22;q11-22) и полное ее отсутствие при inv(16)(p13q22).

В группе с эволюцией инициальный уровень лейкоцитов был достоверно выше, однако по другим гематологическим показателям не выявлено достоверных отличий. При этом у пациентов с эволюцией лейкоемического клона в 2,5 раза чаще регистрировали раннюю смерть до достижения ремиссии, что может соответствовать более тяжелому их инициальному статусу, а также отмечена более высокая частота рецидивов. Относительно первичной рефрактерности к ХТ отличий не было выявлено.

Статистический анализ уровня пятилетнего бессобытийного выживания пациентов с ОМЛ показал, что при регистрации эволюции лейкоемического клона коэффициент был на 15 % ниже, чем в группе больных без эволюции клона.

Все эти данные свидетельствуют о неблагоприятном прогностическом значении феномена клональной эволюции в лейкоемических клетках при постановке диагноза ОМЛ у детей.

До настоящего времени не существует однозначного толкования феномена эволюции опухолевого клона, предпочтительно мнение исследователей, связывающих этот феномен с опухолевой прогрессией. Анализ 14 случаев поэтапного становления клональной эволюции, зарегистрированной на момент постановки диагноза, в результате которых появляется несбалансированный клон, позволил предположить механизмы усложнения перестроек в геноме лейкоемической опухоли.

Концептуально мы полагаем, что первым событием является сбалансированная перестройка, вторым — трисомия и/или моносомия и затем — делеция.

Выводы. Проведенные исследования показали, что полиплоидия встречается в клонах со структурной перестройкой. Обсуждаются возможные причины появления полиплоидии, в числе которых получение преимуществ в пролиферативной активности аномальной популяции перед клетками со структурной перестройкой в геноме. Потеря трисомий хромосом в клонах с признаками эволюции в результате химиотерапии и сохранение при этом структурных перестроек рассматриваются как подтверждение модели становления таких

эволюций лейкоемического клона. Сопоставление структуры эволюции клона на момент постановки диагноза и в рецидиве ОМЛ, несмотря на небольшое число наблюдений, показало схематическое подобие структуры эволюции в динамике заболевания, что позволяет предположить — в основе возникновения некоторых типов эволюции хромосомных аномалий в лейкоемических клетках при ОМЛ лежит инициальное этиопатогенетическое влияние химических агентов на геном гемопоэтических клеток.

Выражаем благодарность за помощь в работе сотрудникам лаборатории специализированной диагностики гематологических заболеваний Центра детской онкогематологии и трансплантации костного мозга НДСБ «ОХМАТДИТ».

S.V. Andreieva,

V.D. Drozdova, N.V. Kavardakova

PHENOMENON OF THE EVOLUTION
OF CLONAL CHROMOSOMAL
ABNORMALITIES IN CHILDHOOD
ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Analysis of chromosomal abnormalities in bone marrow cells in 116 children with diagnosis of acute myeloid leukemia (AML) was performed. Frequency of evolution of clonal chromosome abnormalities in AML constituted 42,3 %. The most abundant among them were numerical abnormalities of chromosomes 8, 9, and 21 as well as secondary structural abnormalities in region 12p12, 9p22, 9q22, 9q34, 11q14–23, and 16q22. Numerical abnormalities were registered in 26,7 % cases. The basic mechanism of leukemic clone evolution was trisomy, deletion and monosomy. The frequency of evolution was 7 times higher in the age group up to 2 years and twice higher in the age group up to 5 years. The high frequency of evolution was established at t(15;17)(q22;q22) and the absence at inv(16)(p13q22). The patients with clonal evolution died earlier, before reaching remission, that can be connected with heavy initial state and high frequency of relapse. Conception of abnormality clone evolution was proposed at some stages: I — appearance of balanced rearrangement; II — trisomy; III — lose of chromosomal material. Appearance of unbalanced genome in evolution possess an advantage in proliferate activity and can be connected with the answer on chemotherapy. Identity of abnormal chromosome structure at diagnosis and relapse of disease can be an evidence of the influence of chemical agent on establishment of some types of evolution of chromosome abnormalities in leukemic cells in AML in children.

С.В. Андреева,
В.Д. Дроздова, Н.В. Кавардакова
ФЕНОМЕН ЕВОЛЮЦІЇ КЛОНАЛЬНИХ
ХРОМОСОМНИХ АНОМАЛІЙ
ПРИ ГОСТРІЙ МІЄЛОЇДНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ
В ДИТЯЧОМУ ВІСІ

Проведено аналіз хромосомних аномалій клітин кісткового мозку при встановленні діагнозу гостра мієлоїдна лейкемія (ГМЛ) у 116 дітей. Частота еволюції клональних аномалій хромосом при ГМЛ становила 42,3 %. Найчастіше зустрічалися кількісні аномалії хромосом 8, 9 і 21, вторинні структурні – в дисках хромосом 12p12, 9p22, 9q22, 9q34, 11q14–23, 16q22. Кількісні аномалії реєстрували у 26,7 % випадках. Основним механізмом еволюції пухлинного клону була поява трисомії, делеції і моносомії. Еволюція зустрічалася в 7 разів частіше у віковій групі до двох років і в 2 рази частіше – в групі до п'яти років. Виявлена висока частота еволюції при t(15;17)(q22;q22) і повна її відсутність при inv(16)(p13q22). У пацієнтів з еволюцією лейкемічного клону в два рази частіше реєстрували більш високу частоту рецидивів, а також ранню смерть до досягнення ремісії, що може відповідати більш важкому ініціальному статусу цих пацієнтів. Запропоновано концепцію еволюції аномального клону в декілька етапів: I – поява збалансованої перебудови, II – поява трисомії, III – втрата генетичного матеріалу. Поява незбалансованості геному в результаті еволюції може давати переваги в проліферації клону і бути пов'язана з відповіддю на хіміотерапію. В результаті співставлення каріотипів на час встановлення діагнозу і в рецидиві захворювання виявлено ідентичність структури аномалій хромосом, що може свідчити про можливий вплив хімічних агентів на виникнення деяких типів еволюції хромосомних аномалій в лейкемічних клітинах при ГМЛ у дітей.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Desai J., Shankar S., Heinrich M.C., Fletcher J.A., Fletcher C.D., Manola J., Morgan J.A., Corless C.L., George S., Tuncali K., Silverman S.G. Clonal evolution of resistance to imatinib in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors // Clin Cancer Res. – 2007. – 13, № 18. – P. 5398–5405.
2. Heng H.H., Stevens J.B., Liu G.J., Liu H.H., Stevens J.B., Liu G., Brenuk S.W., Ye K.J., Reddy P.V., Wu G.S., Wang Y.A., Tainsky M.A., Ye C.J. Stochastic cancer progression driven by non-clonal chromosome aberrations // Cell Physiol. – 2006. – 208, № 2. – P. 461–472.
3. Patchenko P., Klepfish A., Trakhtenbrot L., Rothman R., Rachmilewitz E.A. Reciprocal relationship between a Ph-negative clone with trisomy 8 associated with severe myelodysplasia and a Ph-positive clone following imatinib treatment in a patient with accelerated – phase chronic myelogenous leukemia (CML) // Amer. J. Hematol. – 2004. – 77, № 4. – P. 420.
4. Flamm M.J., Murty V.V., Rao P.H., Nicols G.L. Coexistence of independent myeloblastic and Philadelphia chromosome positive clones in patient treated with hydroxyurea // Leuk. Res. – 2002. – 26, № 4. – P. 417–420.
5. Picos-Gardenas V.J., Meza-Espinoza J.P., Gutierrez-Angulo M., Esparza-Flores M.A., Ayala-Madriral M.L., Hansmann J., Gonzales G.J. Paternal isodisomy 7q secondary 7 at recurrence in a Down syndrome child with acute myelogenous leukemia // Cancer Genet. Cytogenet. – 2002. – 134, № 2. – P. 138–141.
6. Roy S., Szer J., Campbell L.J., Juncja S. Sequential transformation of t(8;13)-related disease: a case report // Acta Haematol. – 2002. – 107, № 2. – P. 95–97.
7. Ono R., Taki T., Taketani T., Taniwaki M., Kobayashi H., Hayashi Y. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q32;q23) // Cancer Res. – 2002. – 62, № 14. – P. 4075–4080.
8. Sashida G., Ito Y., Nakajima A., Kawakubo K., Kuriyama Y., Yagasaki F., Bessho M., Ohyashiki K. Multiple myeloma with monosomy 13 developed in trisomy 13 acute myelocytic leukemia: numerical chromosome abnormality during chromosomal segregation process // Cancer Genet. Cytogenet. – 2003. – 141, № 2. – P. 154–156.
9. Bacher U., Schnittger S., Kern W., Harich H.D., Schnittger S., Haferlach C. Acute myeloid leukemia (AML) with t(8;21)(q22;q22) relapsing as AML with t(3;21)(q26;q22) // Cancer Genet. Cytogenet. – 2006. – 168, № 2. – P. 172–174.
10. Marsden K.A., Pearse A.M., Collins G.G., Ford D.I., Heard S., Kimber R.I. Acute leukemia with t(1;3)(p36;q21), evolution to t(1;3)(p36;q21), t(14;17)(q32;q21) and loss of red cell A and le^e antigens // Cancer Genet. Cytogenet. – 1992. – 64. – P. 80–85.
11. Campiotti L., Appio L., Casalone R., Righi R., Agno W., Solbiati F., Grandi A.M., Venco A. Acute myeloid leukemia with associated translocation t(15;17) and 11q23/MLL abnormality // Leuk. Lymphoma. – 2008. – 49, № 3. – P. 592–595.
12. Mrozek K., Heinonen K., Bloomfield C.D. Clinical importance of cytogenetics in acute leukemia // Best Pract. Res. Clin. Haematol. – 2001. – 14, № 1. – P. 14–47.
13. Grimwade D., Walker H., Oliver F., Wheatley K., Harrison C., Harrison G., Rees J., Hann I., Steven S.R., Burnett A., Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1.612 patients entered into the AML10 trial. The medical Research Council adult and children's leukemia

- working parties// *Blood*. – 1998. – **92**, № 7. – P. 2322–2333.
14. *Manola K.N., Georgakakos V.N., Margaritis D., Stavropoulou C., Panos C., Kotsianidis I., Pantelias G.F., Sambani C.* Disruption of the ETV6 gene as a consequence of the rare translocation (12;12)(p13;q13) in treatment-induced acute myeloid leukemia after breast cancer// *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2008. – **180**, № 1. – P. 37–42.
 15. *Klaus M., Haferlach T., Schnittger S., Kern W., Hiddemann W., Schoch C.* Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1 and M2: study based on 652 cases analyzed with morphology, cytogenetics and fluorescence in situ hybridization// *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2004. – **155**, № 1. – P. 47–56.
 16. *Duell T., Poleck-Dehlin B., Schmid C., Wunderlich B., Ledderose G., Mittermuller J., Kolb H.J., Schmetzer H.* Clonal karyotype evolution involving ring chromosome 1 with myelodysplastic syndrome subtype RAEB-t progressing into acute leukemia // *Acta Haematol.* – 2006. – **116**, № 2. – P. 131–136.
 17. *Olney H.J., Mitelman F., Johansson B., Mrozek K., Berger R., Rowley J.D.* Unique balanced chromosome abnormalities in treatment-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: report from an international workshop // *Genes Chromosome Cancer*. – 2002. – **33**, № 4. – P. 413–423.
 18. *Olshanskaya Y.V., Demidova I.A., Teurina N.B., Udovitchenko R.G., Parovitchnikova E.N., Domratcheva E.V., Savechenko V.G.* Combined cytogenetic, FISH and RT-PCR technique in detectin of t (15;17) and monitoring of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia // *Acute leukemias 8. Prognostic factors and treatment strategies*. – 2001. – **40**. – P. 40–43.
 19. *Fleshman E.V., Sokova O.I., Kirechenko O.P., Konstantinova L.N., Metelkova N.F., Popa A.V., Shneider M.M.* Complex karyotype abnormalities in padiatric acute myeloid leukemia // *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* – 2008. – № 5. – P. 3–7.
 20. *Gozzeti A., Tozzuoli D., Crupi R., Pirroya M.T., Bucalossi A., Mazzotta S., Laura F.* A case of adult acute myelocytic leukemia (M5a) with a near-tetraploid karyotype characterized by monosomies 5 and 16 // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2004. – **150**, № 1. – P. 88–89.
 21. *Kojima K., Imaoka M., Noguchi T., Narumi H., Uchida N., Sakai I., Yasukawa M., Fujita S.* Hypocellular acute promyelocytic leukemia with a tetraploid clone characterized by two t(15;17) // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2003. – **145**, № 2. – P. 169–171.
 22. *Oh A.H., Park T.S., Kim H.H., Chang C.L., Lee E.Y., Son H.C., Chung J.S., Cho G.J.* Tetraploid acute promyelocytic leukemia with doubl t(15;17) and PML/RARA rearrangements detected by fluorescence in situ hybridization analysis// *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2003. – **145**, № 1. – P. 49–53.
 23. *Imkie M., Davis M.K., Persons D.L., Cunnindham M.T.* Biphasic acute myeloid leukemia with near-tetraploidy and immunophenotypic transformation // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2004. – **128**, № 4. – P. 448–451.
 24. *Xue Y., He J., Wang Y., Guo Y., Xie X., He Y., Chai Y., Ruan Z.* Secondary near-pentaploidy and/or near-tetraploidy characterised by the duplication of 8;21 translocation in the M2 subtype of acute myeloid leukemia // *Int. J. Hematol.* – 2000. – **71**, № 4. – P. 359–365.
 25. *Zelante L., Perla G., Bodenizza C., Greco M.M., Carotenuto M., Dallapiccola B.* Tetraploidy (92, XXYY) in an acute nonlymphocytic leukemia (M1) patient following autologous bone marrow transplantation // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 1989. – **36**, № 1. – P. 69–75.
 26. *Morita Y., Takahashi A., Yamamoto K., Miki T., Murakami N., Miura O.* Secondary near-tetraploidy with double der (15) t (15;17) in acute promyelocytic leukemia in relapse // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2004. – **149**, № 2. – P. 131–136.
 27. *Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D.* The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms // *Blood*. – 2002. – **100**, № 7. – P. 2292–2302.
 28. *Human Cytogenetics. A Practical Approach. Malignancy and Acquired Abnormalities. Second edition / Eds D.E. Rooney, B.H. Czepulkovsky.* – Oxford etc. : IRL Press at Oxford Univ. press, 1995. – 293 p.
 29. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature /Eds L.G. Shaffer, N. Tommerup.* – New York etc. : Karger, 2005. – 128 p.
 30. *Андреева С.В.* Феномен эволюции клональных хромосомных аномалий при остром лимфобластном лейкозе в детском возрасте // *Укр. журн. гематології та трансфузіології.* – 2008. – **8**, № 4. – С. 5–9.
 31. *Harrison C.J.* The management of patients with leukemia: role of cytogenetics in this molecular era // *Brit. J. Haematol.* – 2000. – **108**. – P. 19–30.
 32. *Gruhn B., Taub J.W., Ge Y., Beck J.F., Zell R., Hofer R., Hermann H.H., Debatin K.M., Steinbach D.* Prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia, association with birth weight and hyperdiploidy // *Leukemia*. – 2008. – **22**, № 9. – P. 1692–1697.
 33. *Iyer R.V., Sait S.N., Matsui S., Block A.W., Barcos M., Slack J.L., Wetzler M., Baer M.R.* Massive hyperdiploidy and tetraploidy in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2004. – **148**, № 1. – P. 29–34.
 34. *Spiekermann R.* Biology of AML with a normal karyotype // *Acute leukemias. 11. Prognostic factors and treatment strategies.* Febr. 18–22, 2006, Munich,

- Germany // *Ann. Hematol.* – 2006. – **85**, suppl.1. – P. 107–110.
35. Mrozek K., Marcucci G., Ruppert A.S., Balduss C.D., Kolitz J.E., Larson R.A., Bloomfield C.D. Molecular heterogeneity and its prognostic significance in acute myeloid leukemia (AML) with normal cytogenetics // *Ibid.* – P. 114–117.
36. Nagl W. Genetics. 1. Replication // *Prog. Bot.* – 1987. – **49**. – P. 181–191.
37. Schoch C., Kohlmann A., Dugas M., Kern W., Schnittger S., Haferlach T. Impact of trisomy 8 on expression of genes located on chromosome 8 in different AML subgroups // *Genes, Chromosomes and Cancer.* – 2006. – **45**, № 12. – P. 1164–1168.
38. Jaju R.J., Boultonwood J., Oliver F.J., Kostrzewa M., Fidler C., Parker N., McPherson J.D., Morris S.W., Muller U., Wainscoat J.S., Kearney I. Molecular cytogenetic delineation of the critical deleted region in the 5q-syndrome // *Genes, Chromosomes and Cancer.* – 1998. – **22**. – P. 251–256.
39. Thelander E.F., Ichimura K., Circoran M., Barbany G., Nordgren A., Heyman M., Berglund M., Mungall A., Rosenquist R., Collins V.P., Grander D., Larsson C., Lagercrantz S. Characterization of 6q deletions in B cell lymphomas and children acute lymphoblastic leukemia // *Leuk. Lymphoma.* – 2008. – **49**, № 3. – P. 477–487.
40. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // *Биополимеры и клетка.* – 1994. – **10**, № 6. – С. 5–35.
41. Бродский В.Я., Урываева И.М. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. – М.: Наука, 1981. – 259 с.

Поступила 07.04.09