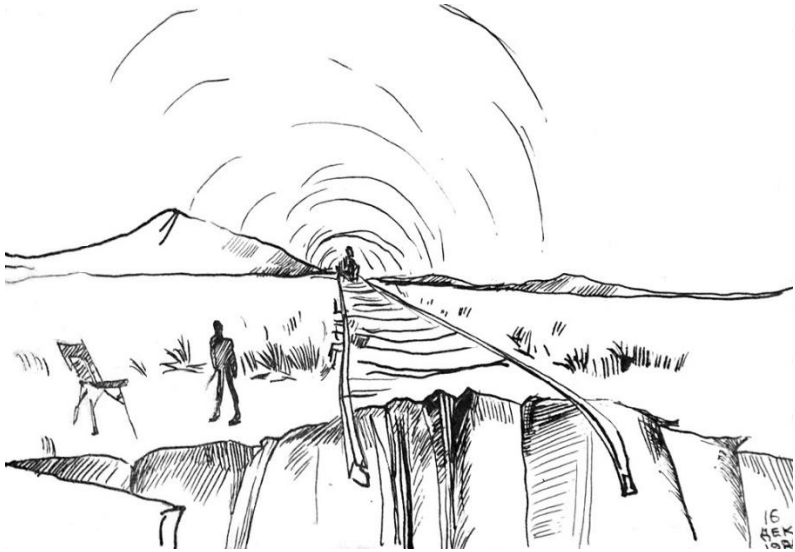


Сіренко А. Г.

Центромера та онкогенез



Івано-Франківськ
2020

ББКК 28.4

С40

УДК: 576.312.32:38:616-006.446.2:616-076.5

Центромера та онкогенез / Сіренко А. Г. – Івано-Франківськ: Територія друку, 2020. – 332 с.

Монографія присвячена проблемам онкогенезу, зокрема, питанням зв'язку функціонування центромер та онкогенезу. Наведено результати дослідження феноменів передчасного розділення центромер (ПРЦ) та передчасної анафази (С-анафази) в контексті їх зв'язку з онкогенезом, малігнізацією, стабільністю геному, мутагенезом. Розглядаються питання діагностичного та прогностичного значення цих феноменів при гострих лейкозах, лімфомах, гіпопластичних анеміях. Для біологів, лікарів, онкологів, студентів медичних та біологічних спеціальностей університетів.

Рецензенти:

доктор біологічних наук, професор Сімчук А. П.

доктор медичних наук, професор Крижанівська А. Є.

Друкується за ухвалою Вченої ради ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника»

© Сіренко А. Г., 2020

Зміст

Список умовних скорочень	5
Вступ	6
1. Історія дослідження гострих лейкозів	12
2. Гострий лімфобластний лейкоз – загальна характеристика патології	27
3. Хромосомні мутації при гострих лімфобластних лейкозах у дітей	34
4. Гострий мієлобластний лейкоз – загальна характеристика патології	36
5. Хромосомні аномалії при гострих мієлобластних лейкозах	43
6. Негоджкінські лімфоми: історія дослідження та загальна характеристика патології	43
7. Ідіопатична гіпопластична анемія: історія дослідження і характеристика патології	55
8. Вірус Епштейна-Барр	62
9. Феномен передчасного розділення центромер – загальна характеристика явища	63
10. Проліферація та онкогенез	68
11. Аномалії хромосом і онкотрансформація	96
12. Молекулярно-генетичні механізми онкогенезу	112
13. Хромосомні аномалії і проблема класифікації гострих лейкозів	125
14. Проблема критеріїв ремісії гострих лейкозів	129
15. Центромера в нормальній клітині	130
16. Феномен передчасного розділення центромер при різних патологіях	148
17. Феномен передчасного розділення центромер метафазних хромосом при онкологічних захворюваннях	152
18. Апоптоз як регулятор клітинного гомеостазу	155
19. Паралельна ресстрація індукції апоптозу і	

цитогенетичних варіантів клітинної конституції	164
20. Власні дослідження.	166
20.1. Обладнання та реактиви	166
20.2. Методи досліджень	167
20.3. Статистична обробка отриманих результатів	174
20.4. Контрольна група	174
20.5. Феномен передчасного розділення метафазних хромосом при гострому лімфобластному лейкозі в дітей	176
20.5.1. Клінічна характеристика обстежених осіб	176
20.5.2. Зв'язок феномену передчасного розділення центромер метафазних хромосом з патогенезом і перебігом гострого лімфобластного лейкозу	188
20.6. Феномени передчасного розділення центромер та С-анафази у хворих на гострий мієлобластний лейкоз	226
20.7. Феномени передчасного розділення центромер та С-анафази при негоджкінській лімфомі	245
20.8. Феномени передчасного розділення центромер та С-анафази при ідіопатичній гіпопластичній анемії	251
20.9. Центромера і досі в сутінках. Роль центромери в патологічних процесах клітинного рівня – більше питань ніж відповідей.	265
Висновки	293
Практичні рекомендації	295
Подяки	296
Література	297

Список умовних скорочень

- АПК – анафазно-промоторний комплекс.
В-ГЛЛ – В-клітинний гострий лімфобластний лейкоз.
ВЕБ – вірус Епштейна-Барр.
ВРХ – велика рогата худоба.
ГЛЛ – гострий лімфобластний лейкоз.
ГМЛ – гострий мієлобластний лейкоз.
ГММЛ – гострий мієло-монобластний лейкоз.
ГНЛ – гострий недиференційований лейкоз.
ГпроМЛ – гострий промієлобластний лейкоз.
КМ – кістковий мозок.
ІПА – ідіопатична гіпопластична анемія.
ЛОДСКЛ – Львівська обласна дитяча спеціалізована клінічна лікарня.
МДС – мієлодиспластичний синдром.
НГЛ – негоджкінські лімфоми.
ПК – периферійна кров.
ПКХ – передчасна конденсація хромосом.
ПРЦ – передчасне розділення центромер.
рh-хромосома – філадельфійська хромосома.
С-анафаза – передчасна анафаза.
Т-ГЛЛ – Т-клітинний лімфобластний лейкоз.
ФГА – фітогемаглютинін.
ХГ або ЛГ – хвороба Годжкіна або лімфома Годжкіна.
ХЛЛ – хронічний лімфобластний лейкоз.
ХМЛ – хронічний мієлобластний лейкоз.

Вступ

*«Нехай не зрозумів я
Глибин таємних
Старого ставу,
Але і нині розрізняю
Сплеск у тиші...»*

(Кагава Кагекі)

Проблема онкогенезу, його механізмів, його зв'язок з різними субклітинними структурами, процесами, що відбуваються в клітині на молекулярному рівні, лишається чи не найбільш актуальною проблемою сучасної медицини, цитології та медичної генетики. Не дивлячись на значний прогрес у дослідженнях онкогенезу за останні 50 років, проблеми ранньої діагностики, лікування, попередження, прогнозу перебігу багатьох онкологічних захворювань досі є не до кінця вирішеними, не дивлячись на передбачення багатьох авторитетних спеціалістів у цій галузі. Колись, після відкриття таких феноменів як апоптоз, онкогени, теломери, репарації ДНК, хіміотерапії вважалося, що проблеми онкогенезу, лікування, попередження онкологічних захворювань будуть вирішені протягом найближчих років, але час проходив, а низка різних онкологічних захворювань так і лишаються важкими проблемами медицини. Лікування багатьох онкологічних захворювань (не дивлячись на значний прогрес медицини, просто революційні перетворення в медицині) часто є важким, тривалим, проблемним і (на жаль) не завжди успішним. Низка онкологічних захворювань досі мають високу летальність, не дивлячись на сучасне інтенсивне лікування. На сьогодні всім очевидно, що проблема далеко не така проста, як це видавалося дослідникам в 1980-их роках. Гостро стоїть питання всебічного вивчення різних аспектів онкогенезу.

Однією з таких проблем є проблема стабільності геному. Нестабільність геному є причиною більш високої частоти мутацій протоонкогенів – як первинних мутацій, що спричинюють онкотрансформацію, так і вторинних мутацій онкотрансформованих клонів клітин, що посилюють малігнізацію та злоякісність ракових клонів клітин. І далеко не всі випадки нестабільності геному знайшли своє пояснення через порушення репарації ДНК, порушення роботи так званих «молекулярних поліцейських», порушення апоптозу, наявності генів-мутаторів, мутабільних генів чи транспозонів. Проблема причин нестабільності геному вийшла далеко за межі теоретичної генетики і цитогенетики. На сьогодні поширена думка, що якщо колись буде вирішена проблема онкологічних захворювань, то вона буде вирішена на рівні імунітету і ключ до розв'язання проблем онкології імунологічний. Справді, згідно із сучасними даними, у кожної людини кожен день виникають ракові клітини в результаті мутацій протоонкогенів. Але не всі люди хворіють на рак – тільки деякі. Спрацьовують механізми захисту – вмикаються процеси репарації ДНК, робота «молекулярних поліцейських», що виводять потенційно небезпечну клітину з клітинного циклу, апоптозу і нарешті імунітету, коли спеціалізовані клітини розпізнають і знищують ракові клітини. І лише тоді, коли всі ці механізми не спрацьовують, настає у конкретного пацієнта онкологічне захворювання. Але постає питання – чи всі механізми захисту на клітинному рівні нам відомі? Чи відомі нам всі причини нестабільності геному і підвищеного мутагенезу?

Ця книга присвячена питанням зв'язку поведінки центромери і онкогенезу. Зокрема, тут наводяться результати досліджень зв'язку таких досі загадкових феноменів як передчасне розділення центромер (ПРЦ) та

передчасної анафази (С-анафази) з онкогенезом та стабільністю геному. Розглядаються проблеми зв'язку цих феноменів з виникненням анеуплоїдних та поліплоїдних клонів при різних онкологічних захворюваннях. Розглядаються питання діагностичного та прогностичного значення феноменів ПРЦ та С-анафази при різних онкологічних захворюваннях, зокрема при гострих лейкозах та лімфомах. Наводяться результати досліджень цих феноменів при ідіопатичній гіпопластичній анемії (ІГПА) – одного з найбільш загадкових і недосліджених гематологічних захворювань. Щодо зв'язку феноменів ПРЦ та С-анафази з онкотрасформацією були досліджені такі онкологічні захворювання як гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ), гострий мієлобластний лейкоз (ГМЛ) та негоджкінська лімфома (НГЛ). Гострі лейкози на сьогодні є найбільш частими онкологічними захворюваннями у дітей, лікування їх інколи є безуспішним, не дивлячись на розвиток хіміотерапії, радіології та трансплантології.

З часів відкриття хромосом, а особливо після запізненого, але доречного становлення цитогенетики як науки, центромера періодично викликала зацікавлення дослідників. Проте, інтерес до центромери як з'являвся так і падав – зацікавлення змінювалось розчаруванням і центромера лишається однією з найменш досліджених структур клітини взагалі та генетичного апарату зокрема. Проте, починаючи з 1960-тих років накопичилось чимало результатів та публікацій, що стосувались центромери та механізмів розходження центромер під час мітозу. Деякий час дослідження центромер вважали малоперспективним заняттям – більший інтерес викликали дослідження теломер та їх зв'язок з такими процесами як проліферація, апоптоз, старіння клітин, фізіологічна смерть клітин і організму. Але нині все більше дослідників задає питання – яку роль відіграє центромера у цих і в багатьох інших як

нормальних, так і патологічних процесах в клітині. Але не дивлячись на певний прорив у цій царині, відкриття генів РТТГ, що пов'язані з контролем процесу розділення центромер, відкриття білків-секуринів, сепаринів і протеїнів когензинового комплексу, що безпосередньо контролюють процес розділення центромер, низка аспектів ролі центромери в клітинних процесах досі лишаються недослідженими. Так, зокрема, мало досліджені питання – як пов'язані процеси розділення центромер та онкотрансформація, як взагалі пов'язана центромера з онкогенезом, з процесами апоптозу. Власне, цим аспектам дослідження центромери і присвячена ця книга. Не випадково модельними об'єктами онкогенезу були взяті такі процеси, як патогенез гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ), гострого мієлобластного лейкозу (ГМЛ) та негоджкінської лімфоми (НГЛ). ГЛЛ є найпоширенішим онкологічним захворюванням у дітей і отримати статистично достовірну вибірку було найлегше саме досліджуючи це захворювання. По-друге, працювати з лімфобластами, взятими у хворого на ГЛЛ технічно було значно простіше, аніж з іншими онкотрансформованими клітинами. Працюючи з клітинами хворих на ГМЛ та НГЛ, автор зіштовхнувся з додатковими труднощами і вибірку для аналізу вдалось отримати значно меншу, проте репрезентабельну.

Крім вищезазначеного актуальність цієї роботи і книги, де викладені результати багаторічних досліджень, полягає в тому, що лікування хворих на онкологічні захворювання передбачає наявність всебічної об'єктивної інформації як про тип (чи підтип) злоякісного клітинного клону, так і про масштаби генного дисбалансу геному клітин, що виник внаслідок зміни структури та (або) кількості хромосом. Як відомо, в залежності від характеру вторинних змін хромосом можна передбачити деякі

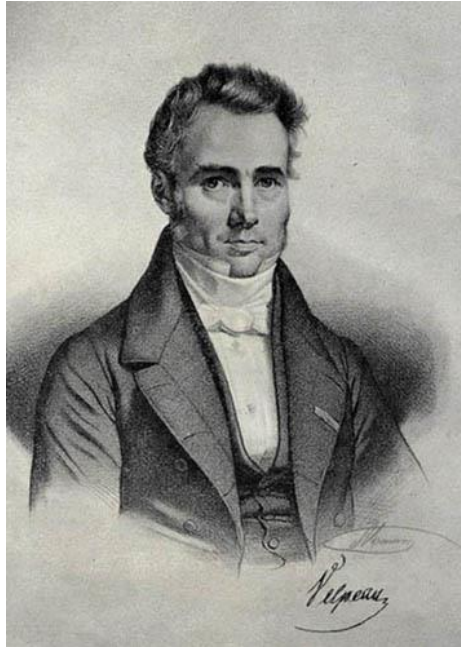
ознаки пухлинного процесу, зокрема важкість перебігу, стійкість до традиційних схем хіміотерапії, імовірність досягнення стійкої ремісії та ризик нового рецидиву захворювання. Визначальними критеріями щодо вибору тактики лікування та оцінки прогнозу онкологічних захворювань вважають наявність структурних перебудов хромосом та зміни пліодності каріотипу клітин в онкотрансформованих клонах. Але піднімається питання і про інформативність деяких інших цитогенетичних маркерів, діагностична цінність яких поки що не визначена, і, зокрема, явища передчасного розділення центромер метафазних хромосом (ПРЦ). Автор відводить цьому явищу провідну роль у формуванні анеуплоїдного каріотипу клітин, що є характерною ознакою багатьох форм ракових клітин при різних онкопатологіях. Відповідно припускається безпосередня причетність цього явища до виникнення пухлинного процесу та взаємозв'язок із особливостями його перебігу.

Для пошуків відповіді на ці та інші питання проблем онкогенезу автор досліджував феномени ПРЦ та С-анафази (молекулярні механізми яких досі невідомі) у хворих на різні форми гострих лейкозів та негоджкінських лімфом на різних стадіях перебігу цих захворювань, на стадії тривалої ремісії та в контрольній групі здорових людей. Не тільки автор цієї книги, але і різні дослідники в різних країнах і в різний час демонстрували невинуватість явищ ПРЦ та С-анафази при різних патологіях – як онкологічних, так і не пов'язаних з онкогенезом. Автор ставив собі за мету встановити діагностичне та прогностичне значення ПРЦ та С-анафази при різних досліджуваних патологіях. Зв'язок феноменів ПРЦ та С-анафази з явищами апоптозу і досі лишається недослідженим. Автор щодо цього лишає питання

відкритим, але не виключає певних взаємопов'язаних процесів щодо цих явищ і феноменів.

Наукова новизна цієї роботи полягає в тому, що вперше досліджено прояв передчасного розділення центромер метафазних хромосом у культивованих клітинах кісткового мозку та периферійної крові при гострому лімфобластному лейкозі, гострому мієлобластному лейкозі, негоджкінській лімфомі, ідіопатичній гіпопластичній анемії у дітей. Встановлено типові ознаки прояву цього явища в мітотичних клітинах кісткового мозку і периферійної крові на різних стадіях перебігу ГЛЛ, ГМЛ, НГЛ, ІПА. Досліджено феномен ПРЦ із залученням різної кількості хромосом різних груп. Встановлено статистично достовірну відмінність в експресії цих явищ (ПРЦ та С-анафази) при ГЛЛ, ГМЛ та інших гематологічних захворюваннях у дітей у порівнянні з контролем. Статистично обґрунтовано закономірність змін в експресії передчасного розділення центромер метафазних хромосом у гострій фазі ГЛЛ та на стадії ремісії. Встановлено відмінність в експресії С-анафази та ПРЦ у випадках повної і неповної ремісії при ГЛЛ у дітей. З'ясовано функціональну різномірність явищ С-анафази та ПРЦ. Статистично доведено, що ПРЦ з високою імовірністю відповідає бластним клітинам і є провідною причиною анеуплоїдизації їх каріотипу. Отримано дані, що показують певний зв'язок С-анафази і явища апоптозу. Встановлено, що експресія С-анафази у гострій фазі ГЛЛ на рівні контрольних показників асоціюється з несприятливим прогнозом перебігу захворювання, тоді як її рестрикція на рівні 10 % клітин і вище вказує на високу ймовірність досягнення стійкої ремісії. Продемонстровано кореляцію щодо прогнозу шляхом врахування експресії С-анафази та щодо відомих клініко-лабораторних прогностичних критеріїв.

1. Історія дослідження гострих лейкозів



Альфред-Арман-Луї-Марі Вельпо
(Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau)
(1795 – 1867)
Першовідкривач лейкозів

Перше повідомлення у науковій літературі про лейкоз, як новоописану хворобу, датується 1827 роком. У цьому році французький лікар Альфред-Арман-Луї-Марі Вельпо (фр. – Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau) описав хворобу 63-ти річного квітникаря, у якого розвинулась хвороба, що характеризувалася лихоманкою, слабкістю, сечовипусканням та сильним збільшенням печінки та селезінки. Вельпо зазначив, що кров цієї людини мала

консистенцію «кашеподібну», і припускав, що такий стан крові хворого пояснюється збільшенням кількості білих кров'яних тілець.

Вельпо народився в містечку Бреш, що в департаменті Індр-та-Луара (Франція). Він був учнем доктора П'єра Бреттоно (1778 – 1862), що жив у місті Тур на заході Франції. Вельпо у 1823 році здобув докторську ступінь у Парижі, де згодом працював хірургом. Після смерті Алексіса де Бойера (1757 – 1833) Вельпо отримав посаду завідуючого кафедри клінічної хірургії. На цій посаді він перебував аж до своєї смерті. У 1843 році він став академіком у секції медицини та хірургії АН Франції. Серед його студентів та учнів було чимало видатних лікарів, науковців та навіть політичних діячів. Вельпо прославився в першу чергу як видатний хірург та анатом. Він автор більше 340 наукових термінів у хірургії, ембріології, анатомії, акушерстві. Одна з його найбільш відомих робіт – праця «Елементарний трактат з акушерства або принципи токології та ембріології» (1829). Ще двома відомими фундаментальними працями Вельпо стали книги «Нові елементи оперативної хірургії» (1856) та «Трактат про хвороби області грудей та молочних залоз» (1856). Не дивлячись на свої досягнення в багатьох галузях медицини та біології, Вельпо вважав, що безболісна хірургія неможлива, операція і біль нероздільні, ефір та хлороформ – це «жахливі і страшні засоби» [46].

У 1845 році про низку пацієнтів, що померли із збільшеною селезінкою та зміною «кольору та консистенції крові», повідомив шотландський патологоанатом Джон Х'ю Беннетт (англ. – John Hughes Bennett) (1812 – 1875), що працював в Единбурзі. Він використовував термін «лейкоцитемія» для опису цього патологічного стану. Крім описів і досліджень лейкозів

Беннет відомий першим описом аспергільозу – патології, при якій грибок аспергіл вражає тканини легень людини.



Джон Х'ю Беннетт (John Hughes Bennett)
(1812 – 1875)

Один із перших дослідників лейкозів

Беннет народився в Лондоні, освіту отримав в школі Маунт-Радфорд, що в Екседері. Потім він став учнем Седжвіка – хірурга, що працював в Мейдстоні. У 1833 році почав вчитися в Единбурзі, де в 1837 році захистив дисертацію під назвою «Фізіологія та патологія мозку». Пізніше його обрали президентом Королівського медичного товариства, Королівського фізичного товариства Единбургу та віце-президентом Анатомічного

та фізіологічного товариства Единбургу. Деякий час він вчився у Франції та Німеччині. Результати досліджень лейкозів він опублікував у праці «Гіпертрофія селезінки та печінки» [72].

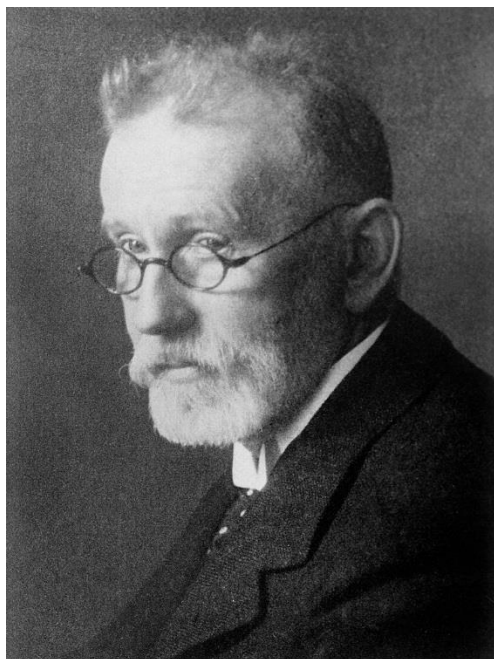


Рудольф Людвіг Карл Вірхов
(Rudolf Ludwig Karl Virchow)

Першим пояснив цитологічну основу патогенезу лейкозів

Слід зазначити, що деякі історики науки вважають першовідкривачем лейкозів Альфреда Франсуа Донне (1801 – 1878) – французького бактеріолога і лікаря. Донне народився в місті Нойон, Франція, а працював і помер у Парижі. Його внесок у дослідження лейкозів вагомий – він першим почав досліджувати лейкози на цитологічному

рівні. Крім цього він першим відкрив вагінальні тріхомонади, першим винайшов мікрофотографію.



Пауль Ерліх (Paul Ehrlich)
(1854 – 1915)

Першим розробив методи фарбування препаратів крові

Термін «лейкемія», що нині є синонімом слова «лейкоз» вперше запропонував німецький паталогоанатом, лікарем, цитолог, онколог, антрополог Рудольф Людвіг Карл Вірхов (нім. – Rudolf Ludwig Carl Virchow) (1821 – 1902) у 1845 році. Він же запропонував виділити лейкози як окрему групу захворювань, вперше відмітив збільшення числа лейкоцитів у крові, як основний клінічний симптом захворювання. Внесок Вірхова у медицину та біологію

настільки вагомий, що йому слід було б присвятити окрему книгу, і в цій праці бракує місця, щоб описати хоча б частину його досліджень та відкриттів. Недарма сучасники називали його «батьком медицини» [94].

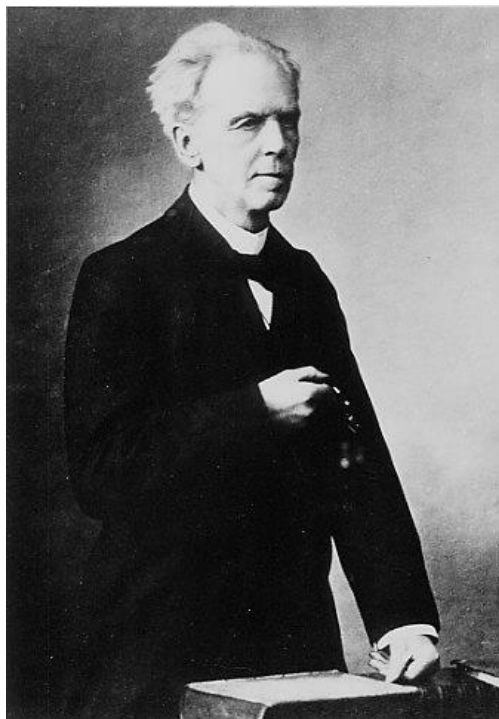


Вільгельм Ебштейн (Wilhelm Ebstein)
(1836 – 1912)

Автор терміну «гострий лейкоз»

Подальший прогрес у вивченні лейкозів був пов'язаний з розвитком технологій. У 1877 році Пауль Ерліх (нім. – Paul Ehrlich) (1854 – 1915) розробив методикку фарбування препаратів крові, що дозволило йому детально описати нормальні та патологічні лейкоцити. Він став лауреатом Нобелівської премії, відомий працями в галузях

гематології, імунології. Був розробником методів антимікробної хіміотерапії.



Франц Ернст Крістіан Нейман
(Franz Ernst Christian Neumann)
(1834 – 1918)

Першим відкрив функції червоного кісткового мозку.

У 1889 році Вільгельм Ебштейн (нім. – Wilhelm Ebstein) (1836 – 1912) запропонував термін «гострий лейкоз» для диференціації швидко прогресуючих та смертельних лейкемій, відрізняючи їх від повільнопрогресуючих форм лейкозів, які потім назвали хронічними лейкозами. Ебштейн був родом з міста Явора

(Польща), навчався в Берліні, був учнем Рудольфа Вірхова і працював у Бреслау (Вроцлаві). Відомий своїми працями в галузях дієтології. Крім лейкозів досліджував цукровий діабет, подагру, ожиріння.



Отто Негелі (Otto Naegeli)
(1871 – 1938)

Описав мієлобласти і класифікував лейкози на лімфобластні і мієлобластні

Термін «мієлоїдна лейкемія» був запропонований Францом Ернстом Крістіаном Нейманом (нім. – Franz Ernst Christian Neumann) (1834 – 1918) в 1869 році. Нейман першим відкрив, що білі кров'яні клітини утворюються в червоному кістковому мозку (грецьке: μυελός, myelos –

кістковий мозок), а не в селезінці, як це вважалося раніше. Нейман був учнем Вірхова, працював в Альбертінському університеті (Кенігсберг), де здобув ступінь доктора. Досліджував гемопоез, еритропоез, лейкопоез, анемії. Відкрив стовбурову клітину червоного кісткового мозку, як клітину, яка започатковує утворення всіх клітин крові.

Методика обстеження червоного кісткового мозку для діагностики лейкозу вперше була запропонована в 1879 році Ф. Мослером (нім. – Mosler F.).

У 1900 році швейцарський гематолог Отто Негелі (нім. – Otto Naegeli) (1871 – 1938) описав клітину мієлобласт як злаякісну клітину при гострому мієлобластному лейкозі (ГМЛ). Отто Негелі розділив лейкоемії на мієлоїцитарні (мієлоїдні) та лімфоїцитарні (лімфоїдні).

Еллерманн (Ellermann) у 1921 році виявив, що при лейкоміях відмічається зниження числа зрілих диференційованих лейкоцитів і переважання серед лейкоцитів незрілих, недиференційованих елементів. Він же запропонував термін «лейкоз». Думку про те, що лейкоз є онкологічним захворювання вперше висловив ще Бірк Л. М. у 1883 році. У ХХ столітті висловлювались різні гіпотези про механізми патогенезу лейкозів і тільки в 80-тих роках ХХ століття було доведено, що мутації протоонкогенів є причиною онкотрансформації попередників клітин крові в червоному кістковому мозку і виникнення злаякісних клонів в периферійній крові хворих на різні форми лейкозів. Була розроблена детальна класифікація лейкозів не тільки за морфологією, але і за імунологічними характеристиками бластних клітин. Було виділено і досліджено протоонкогени і онкогени, що викликають онкотрансформацію клітин при лейкозах, а також були виявлені хромосомні мутації, що зачіпають

протоонкогени і можуть бути причиною розвитку різних форм лейкозів.

Хайхоу (Науhoe) у 1960 році на основі цитологічних досліджень розділив лейкози на наступні групи: лімфобластний, мієлобластний, монобластний, еритробластний. При цьому кожна форма лейкозу може зустрічатися у вигляді хронічного і гострого лейкозу щодо темпів перебігу розвитку патологічних процесів.



Теодор Гайнріх Бовері (Theodor Heinrich Boveri)
(1862 – 1915)

Першим висловив ідею існування онкогенів

У 2008 році був повністю секвінований геном бластної клітини хворого на гострий мієлобластний лейкоз. Це був перший в історії науки випадок повного секвінування геному ракової клітини.

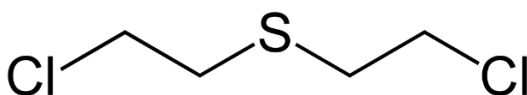
Нині загально визнаною першопричиною патогенезу гострих лейкозів є утворення або привнесення в клітину онкогена з подальшою трансформацією клітин у результаті роботи цього онкогена. Але ця ідея народжувалась довго і мала свою історію.

Онкоген – це ген, експресія якого в клітині перетворює цю клітину з нормальної на ракову. У клітинах наявні чисельні нормальні гени – протоонкогени, мутації яких чи мутації їх регуляторних елементів перетворюють їх на онкогени. Нормальні клітини зазнають апоптозу – запрограмованої загибелі клітин, якщо їх функції змінені або припинені. Онкогени можуть бути причиною виживання клітин, що були призначені для апоптозу. Більшість відомих протоонкогенів – це гени, що контролюють проліферацію клітин та апоптоз. Якщо ген, що є фактором проліферації мутує, це може призвести до посилення його функції, і клітини починають ділитися невинно і неконтрольовано. Множинні онкогени разом з мутованими генами апоптозу та генами супресії проліферації можуть діяти узгоджено, викликаючи онкотрансформацію.

Вперше гіпотезу про існування онкогенів висловив німецький цитолог Теодор Гайнріх Бовері (1862 – 1915) в роботі «Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren» («До питання про походження злоякісних пухлин») у 1914 році.

Але термін онкоген отримав загальне визнання і поширення тільки в 1969 році після публікації робіт Джорджа Тодаро та Роберта Хюбнера, що працювали в Національному інституті раку (США). Першим онкогеном, існування якого було реально доведено був онкоген SRC – онкоген, що викликав розвиток саркоми і містився в одному з ретровірусів курей. Відбулося це в 1970 році. Експерименти д-ра Дж. Стіва Мартіна довели, що ген SRC справді викликає онкотрансформацію клітин. Нуклеотидна

послідовність цього онкогена (v-Src) була розшифрована в 1980 році. Здійснив це Чернілофські А. П. (Czernilofsky A. P.). У 1976 році Домінік Штехелін, Дж. Майкл Бішоп та Гарольд Е. Вармус з Каліфорнійського університету (Сан-Франциско) продемонстрували, що онкогени можуть утворюватись з протоонкогенів, які є в геномах багатьох організмів, включаючи людину. За це їм була присуджена Нобелівська премія в 1989 році.



«Гірчичний газ» = іприт = 2,2'-дихлордиетиловий тіоефір – бойовий отруйний газ, модифікацію якого вперше спробували застосувати як засіб хіміотерапії лейкозів

Загалом, як видно з вищевикладеного, попри те, що гострі лейкози та лімфоми були відкриті та виділені як окремі захворювання ще в середині XIX століття, розуміння суті захворювання прийшло в медичну науку досить пізно. По суті тільки в 1948 році утвердилася в наукових колах думка, що лейкози – це онкологічні захворювання і були здійснені перші спроби лікування лейкозів методами хіміотерапії.

Сама хіміотерапія онкологічних захворювань і гострих лейкозів, зокрема, має свою історію. Вперше ідею хіміотерапії лейкозів та лімфом висловили після проведення досліджень наслідків застосування хімічної зброї. Під час Першої світової війни крім інших токсичних речовин застосовували під час військових дій таку сполуку як «гірчичний газ» (іприт, 2,2'-дихлордиетиловий тіоефір). Хоча застосування хімічної зброї і цієї сполуки, зокрема,

було заборонено міжнародним договором 1925 року, але всі усвідомлювали, що небезпека застосування хімічної зброї існує і дослідження наслідків дії цієї речовини на людський організм тривали.

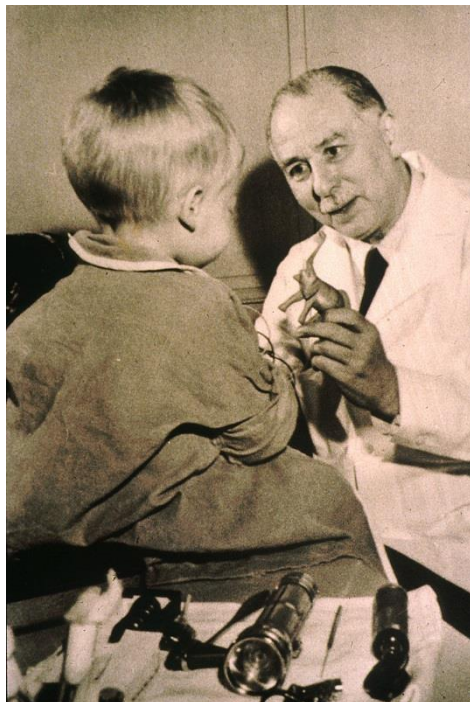


Луїс Санфорд Гудман
(1906 – 2000)

Першим розробив і запропонував методи хіміотерапії
онкологічних захворювань

Фармакологи Єльської школи Луїс С. Гудман та Альфред Гілман виявили, що сполуки подібні до «гірчичного газу», діють на ракові клітини і запропонували модифікувати сполуку з метою зробити її менш леткою для проведення подальших досліджень. Доктор Старт Френсіс Олександр, досліджуючи наслідки враження людей «гірчичним газом» під час Другої світової війни, виявив, що ця сполука пригнічує ріст лімфоїдної та

міелоїдної ліній клітин крові, майже не впливає на певні типи нормальних клітин, але водночас пригнічує певні типи ракових клітин.

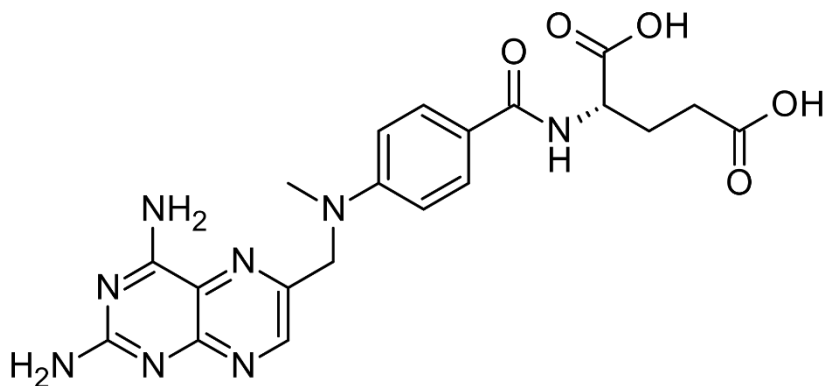


Сідні Фарбер
(1903 – 1973)

Один із піонерів хіміотерапії лейкозів

Опираючись на ці дані Гудман та Гілман запропонували застосовувати сполуки аналогічні «гірчичному газу» для лікування лімфом. Вперше позитивний результат було досягнуто при дії цих сполук на лімфоми мишей. Далі в співпраці з хірургом Густавом Ліндскогом вони спробували застосувати ці сполуки для

лікування негоджкінської лімфоми людини і спостерігали різке зниження маси пухлини в результаті терапії. Повідомлення про перші клінічні випробування цих перших засобів хіміотерапії датуються 1946 роком.



Метотрексат

У той же час – після Другої світової війни Сідні Фарбер з Гарвардської медичної школи дослідила вплив фолієвої кислоти на патогенез лейкозів і виявила, що ця речовина стимулює ріст числа лімфобластів у хворих на гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ). Вона запропонувала застосовувати аналоги фолатів – антагоністів фолієвої кислоти для блокади ферментів, що потребують фолатів і, таким чином, здійснювати хіміотерапію ГЛЛ. Цими першими аналогами були аміноптерин та метотрексат. Цими методами вперше вдалося досягти ремісії у хворих на ГЛЛ у 1948 році. Ці перші випадки ремісії були короткочасними, але це вселяло надію на успіх подальших досліджень. Ці дослідження викликали опір і спротив у тодішніх медичних наукових колах – у той час вважалося, що гострі лейкози принципово невиліковні.

У 1951 році Джейн К. Райт успішно використала метотрексат для лікування солідних пухлин – раку молочної залози. А в 1956 році Рой Герц успішно використав метотрексат для лікування хоріокарциноми та хоріоаденоми.

У 1955 році був створений Національний центр хіміотерапії раку в США завдяки зусиллям доктора Джона Р. Геллера-молодшого.

У 1965 році Джеймс Ф. Голланд, Еміль Фрейрейх та Еміль Фрей запропонували комбіновану хіміотерапію для лікування онкологічних захворювань, припустивши, що раковим клітинам буде складніше протистояти дії комбінації різних хімічних засобів. Завдяки цим технологіям вдалося досягти тривалої ремісії в дітей хворих на ГЛЛ. Були розроблені перші протоколи комбінованої хіміотерапії, завдяки яким ГЛЛ став виліковним.

2. Гострий лімфобластний лейкоз – загальна характеристика патології.

Гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ) – найпоширеніше онкологічне захворювання у дітей. З усіх форм лейкозу більше 80 % захворювання у дітей припадає на ГЛЛ. Першопричиною захворювання є мутація протоонкогену в лімфоїдній лінії кровотворення у червоному кістковому мозку і виникнення клону онкотрансформованих клітин. Імовірність такої мутації різко зростає у людей, що є гомозиготними за мутаціями генів, що забезпечують процес репарації ДНК (анемія Фанконі, синдром Блума та ін.). У чисельних дослідженнях різних авторів відмічено спадковий характер схильності до захворювання на ГЛЛ.

У процесі розвитку захворювання клон злоякісних лімфобластів (при ГЛЛ) витісняє з кісткового мозку клітини нормального кровотворення і починає заселяти периферійну кров.

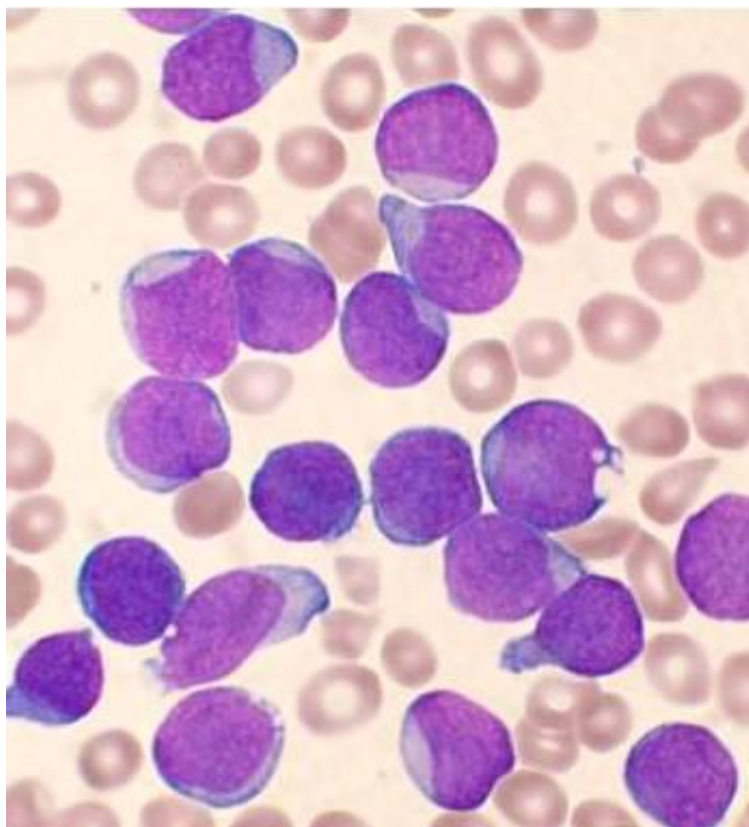


Рис. 2.1. Лімфобласти в периферійній крові хворого на ГЛЛ.

Пік захворювання на ГЛЛ у дітей припадає на вік від 1 до 6 років. У дорослих спостерігається пік захворювання на ГЛЛ у похилому віці – після 60 років.

Серед ГЛЛ трапляються В-клітинні і Т-клітинні форми. Частка В-клітинних форм складає 80 – 85 % випадків захворювання ГЛЛ, Т-клітинних форм 15 – 20 % захворювань. Згідно різних джерел ГЛЛ частіше трапляється у дітей чоловічої статі – співвідношення складає біля 2:1.

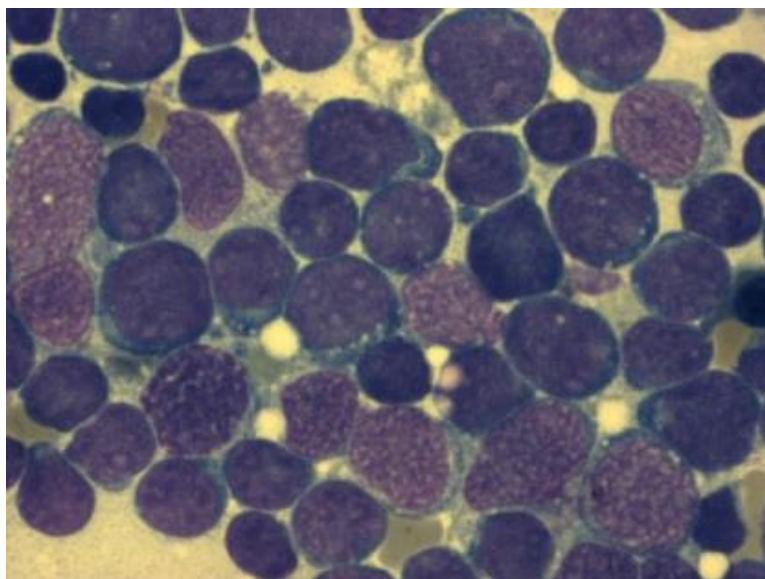


Рис. 2.2. Препарат червоного кісткового мозку хворого на ГЛЛ.

На сьогодні найбільш загальноприйнятою є FAB-класифікація ГЛЛ. Згідно цієї класифікації виділяють наступні різновидності ГЛЛ:

L1 – гострий мікролімфобластний лейкоз – лімфобласти периферійної крові мають малі розміри, ядро не структуроване, ядерця не простежуються. У світовій

практиці відмічено, що 85 % випадків ГЛЛ належать до цього типу.

L2 – лімфобласти периферійної крові мають великі розміри зі структурованим ядром, вираженими 1 або 2 чіткими ядерцями (нуклеолами).

L3 – гострий макролімфобластний або пролімфобластний лейкоз – простежуються у периферійній крові специфічні крупні лімфобласти з ніжно сітчастим хроматином ядра, крупними нуклеолами та базофільною цитоплазмою. Подібні клітини характерні також для лімфому Беркетта.

Крім FAB-класифікації застосовується імунологічна система класифікації ГЛЛ. Розрізняють: В-лімфобласти, пре-В-лімфобласти, пре-пре-В-лімфобласти, про-Т-лімфобласти, пре-Т-лімфобласти, кортикальні Т-лімфобласти, зрілі $\alpha\beta$ Т-лімфобласти, зрілі $\gamma\delta$ Т-лімфобласти. Виділяють ще 0-лімфобластний лейкоз або ні-В-ні-Т- лімфобластний лейкоз.

Симптоми перебігу ГЛЛ пов'язані з зменшенням утворення нормальних клітин крові в червоному кістковому мозку. При цьому ресурси використовуються для проліферації ракових клітин замість нормальних функціональних клітин. Симптоми проявляються у вигляді гарячки, підвищеного ризику інфікування (особливо бактеріальними інфекціями, в тому числі пневмонією), простежується біль у грудях, кашель, блювання, порушення згортання крові (внаслідок тромбоцитопенії), ознаки анемії, в тому числі блідість, тахікардія, втома, головні болі.

У США щорічно фіксується більше 6000 випадків нових захворювань на ГЛЛ. Серед європеїдної раси захворювання діагностується частіше, ніж серед негроїдів чи метисів Латинської Америки. Серед дітей сучасними методами лікування (хіміотерапія + опромінення) вдається

досягти тривалої ремісії у 80 % випадків захворювання. Щодо дорослих, то лише 20 % хворих на ГЛЛ досягають тривалої ремісії. Термін «гострий» щодо лімфобластного лейкозу застосовується у випадках, коли більше 20 % клітин червоного кісткового мозку є онкотрансформованими лімфобластами.

ГЛЛ був першим онкологічним захворюванням щодо якого було розроблене високоефективне лікування методом хіміотерапії. Антифолати типу аміноптерину та метотрексату були розроблені ще наприкінці 40-х років Сідні Фарбер. У ті часи лікар ще не потребував згоди пацієнта чи його батьків на хіміотерапію, оскільки Нюрнберзький протокол ще не був прийнятий. Спочатку при лікуванні ГЛЛ спробували використовувати фолієву кислоту, що мало катастрофічні наслідки для пацієнтів і прискорювало їх смерть.

Мутація протоонкогену в клітинах лімфобластів призводить до неконтрольованого росту популяції клітин лімфобластів, що поширюються по всьому тілу хворого. Активна проліферація клітин відбувається за рахунок порушення міжклітинної сигналізації, або шляхом неадекватного реагування на хімічні сигнали, що контролюють ріст. У результаті мутації може утворитися так званий химерний ген, що складається з частин різних генів, або може порушитись регуляція активності протоонкогену, привнесення його в область роботи іншого промотора. Мутагенами можуть бути хімічні речовини, радіація, різні фізичні процеси на рівні стресу, процеси порушення мітозу чи порушення інших процесів в клітині (механізмів репарації ДНК та ін.), віруси, чужорідна ДНК.

Високий рівень опромінення іонізуючою радіацією є відомим фактором ризику виникнення ГЛЛ. Це було продемонстровано під час досліджень наслідків ядерних вибухів в Хіросімі та Нагасакі. Є дані, які свідчать, що

причинами мутацій, що спричинили ГЛЛ є хімічні речовини, які використовували при лікуванні інших онкологічних захворювань.

Початкові прояви ГЛЛ не є характерними і виникають як порушення нормального кровотворення, зменшення кількості еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів в периферійній крові. Для діагностики необхідні лабораторні дослідження, в тому числі клінічні аналізи крові, цитологічні, біохімічні, пункція кісткового мозку. При ГЛЛ простежується симптоматика, що може змінюватись з перебігом захворювання:

- Загальна слабкість
- Втома
- Запаморочення
- Анемія
- Часті підвищення температури
- Часті інфекції
- Втрата ваги і апетиту
- Надмірні безпричинні гематоми
- Біль у кістках і суглобах
- Задишка
- Збільшені лімфовузли
- Збільшена печінка
- Збільшена селезінка
- набряки кінцівок та/або живота
- Червоні плями та лінії на шкірі

Діагностика ГЛЛ починається з огляду пацієнта, клінічного аналізу крові. Першою підставою для діагнозу ГЛЛ є лейкоцитоз за рахунок лімфоцитозу, «лейкемічний провал» та наявність бластних клітин у препараті периферійної крові. Не слід виключати інших захворювань, що мають ті ж прояви, що ГЛЛ. Переважно, чим вищий рівень лейкоцитозу, тим гірший прогноз. У

більшості випадків ГЛЛ бластні клітини спостерігаються в периферійній крові хворих. Переконливий доказ діагнозу ГЛЛ дає біопсія червоного кісткового мозку з подальшим цитологічним та імунологічним аналізом. Пункція рідини спинного мозку дає можливість встановити, чи відбулось вторгнення бластних клітин у центральну нервову систему.

Імунофенотипування та цитогенетичні дослідження бластних клітин (виявлення характерних хромосомних аномалій) дозволяє встановити: онкотрансформація клітин якої лінії відбулась — мієлобластної чи лімфобластної. РНК-тести дозволяють встановити – наскільки агресивним є захворювання. Різні мутації мають різний прогноз щодо перебігу захворювання. Імуногістохімічні тести дозволяють виявити антигени TdT або CALLA на поверхні лейкозних клітин. TdT — це білок, що експресується в пре-Т та в пре-В клітинах, тоді як CALLA є антигеном, що виявляється в 80 % ГЛЛ та в кризовому піку ХМЛ.

Ультразвукове обстеження може виявити вогнища лімфобластів, що проникли в різні органи: легені, печінку, селезінку тощо.

Завдяки розвитку методів лікування, зокрема хіміотерапії, радіотерапії, методів трансплантації кісткового мозку виживання дітей хворих на ГЛЛ зросло з 0 % у 1970 році до 85 % у 2017 році. Є низка факторів, які впливають на перебіг ГЛЛ:

- Статевий фактор — частота досягнення ремісії у жінок вища, ніж у чоловіків. Чоловіки частіше хворіють на ГЛЛ.
- Етнічний фактор — європеїди частіше хворіють на ГЛЛ, ніж негроїди, монголоїди, метиси. Але імовірність видуження чи тривалої ремісії в європеїдів вища ніж у представників інших рас у випадку захворювання.
- Віковий фактор — діти віком від 1 до 10 років частіше досягають ремісії чи виліковуються, ніж більш старші

вікові групи. У похилому віці ГЛЛ часто викликається хромосомними аномаліями, що пов'язані з поганим прогнозом перебігу захворювання.

- Цитологічний фактор — сприятливий прогноз мають переважно пацієнти у яких рівень бластів в крові менший ніж 50 000/мкл.
- Поширення бластів у ЦНС — поганий прогноз.
- Морфологічні, імунологічні та генетичні підтипи мають різний прогноз перебігу захворювання.
- Реакція організму пацієнта на хіміотерапію впливає на прогноз перебігу ГЛЛ.
- Генетичні патології, такі як синдром Дауна, синдром Блума, анемія Фанконі пов'язані з поганим прогнозом перебігу ГЛЛ.

3. Хромосомні мутації при гострих лімфобластних лейкозах у дітей

Мутації протоонкогенів, як першопричина ГЛЛ можуть бути викликані мутаціями хромосом в лімфоїдних лініях клітин, що зачіпають протоонкогени і є причиною перетворенням їх в онкогени. Серед хромосомних мутацій які фіксуються при ГЛЛ, розрізняють первинні і вторинні. Первинні є причиною появи онкотрансформованого клону клітин, вторинні з'являються в злоякісному клоні пізніше як наслідок нестабільності геному ракових клітин і є причиною додаткової малігнізації і поліморфізму клонів клітин.

Найпоширенішими первинними хромосомними мутаціями при ГЛЛ є:

- t(9;22)(q34;q11.2) – з утворенням так званої «філадельфійської хромосоми» і утворенням химерного онкогену TEL-ALB (інша назва BCR-ABL1). Ця

хромосомна аномалія спричинює біля 3 % ГЛЛ у дітей. Ця форма ГЛЛ характеризується агресивним перебігом.

- $t(12;21)(p13;q22)$ – з утворенням химерного онкогену ETV6-RUNX1 (TEL-AML1). Ця хромосомна мутація часто буває криптичною (мікромутацією). Ця мутація зустрічається в 25 % В-форми ГЛЛ у дітей.
- $t(1;19)(q23;p13)/der(19)t(1;19)$ – з утворенням химерного онкогену E2A-PBX1(TCF3-PBX1). Трапляється у 5 % ГЛЛ у дітей.

Відомі інші первинні хромосомні мутації, що викликають ГЛЛ у дітей, які трапляються значно рідше:

- $t(17;19)$ – з утворенням химерного онкогену E2A-HLF.
- $t(14;18)$ – з утворенням химерного онкогену IGH-BCL-2.
- $t(4;11)$ – з утворенням химерного онкогену MLL-AF4.
- $t(9;11)$ – з утворенням химерного онкогену MLL-AF9.
- $t(11;19)$ – з утворенням химерного онкогену MLL-ENL.
- $t(1;4)$ – з утворенням химерного онкогену ALL1-AF4.
- $del(14q;32.2)$ – з утворенням онкогену BCL11B.
- $del(7q;36.1)$ – з утворенням онкогену EZH2.
- $del(4q;25)$ – з утворенням онкогену LEF1.
- $del(17q;11.2)$ – з утворенням онкогену NF1.
- $del(Xq;26.2)$ – з утворенням онкогену PHF6.
- $del(10q;23.31)$ – з утворенням онкогену PTEN.
- $del(18p;11.2)$ – з утворенням онкогену RPTN2.
- $del(9p;21)$ – з утворенням онкогену CDKN2 (BCR/ABL).

Відома ще ціла низка мутацій при ГЛЛ, які вважають вторинними – не доведено їх первинність і не ідентифіковано онкогени, що пов'язані з цими хромосомними мутаціями, наприклад: $del(7)(q32)$; $del(12)(p11)$ та інші.

4. Гострий мієлобластний лейкоз – загальна характеристика патології

Гострий мієлобластний лейкоз (ГМЛ) – гетерогенна група онкологічних захворювань людини, що виникають в результаті мутації протоонкогенів в мієлоїдній лінії кровотворних клітин. ГМЛ як форма лейкозу характерний для дорослих – у дорослих біля 80 % випадків лейкозів представлені саме мієлоїдними формами. У дітей картина протилежна – 80 – 90 % випадків лейкозів представлені лімфоїдними формами і лише 10 – 20 % мієлоїдними формами.

Оскільки першопричиною виникнення ГМЛ є мутація протоонкогену і виникнення злоякісного клону клітин, то ризик виникнення ГМЛ посилюється дією іонізуючого випромінювання, хімічних мутагенів різної природи біологічних мутагенів (у тому числі вірусів). Високий ризик виникнення ГМЛ є у людей з підвищеним мутагенезом та підвищеною нестабільністю геному, що може бути обумовлена гомозиготністю за мутантними генами, що пов'язані з процесами репарації ДНК. Є низка спадкових синдромів пов'язаних з генами, відповідальними за репарацію ДНК – синдром Блума, анемія Фанконі і т. д.

При ГМЛ злоякісними клітинами є мієлобласти, що не здатні до дозрівання і диференціювання, активно проліферують, накопичуються в кістковому мозку, витісняючи нормальні кровотворні клітини.

Згідно з цитологічною класифікацією ГМЛ розрізняють наступні його форми:

МО – мінімально диференційований ГМЛ

- М1 – ГМЛ без дозрівання клітин
- М2 – промієлоцитарний ГМЛ
- М3 – мієлоцитарний ГМЛ
- М4 – мієломонабластний ГМЛ
- М5a – монобластний ГМЛ
- М5b – моноцитарний ГМЛ
- М6 – еритроїдний ГМЛ
- М7 – мегакаріобластний ГМЛ
- М8 – базофільний ГМЛ.

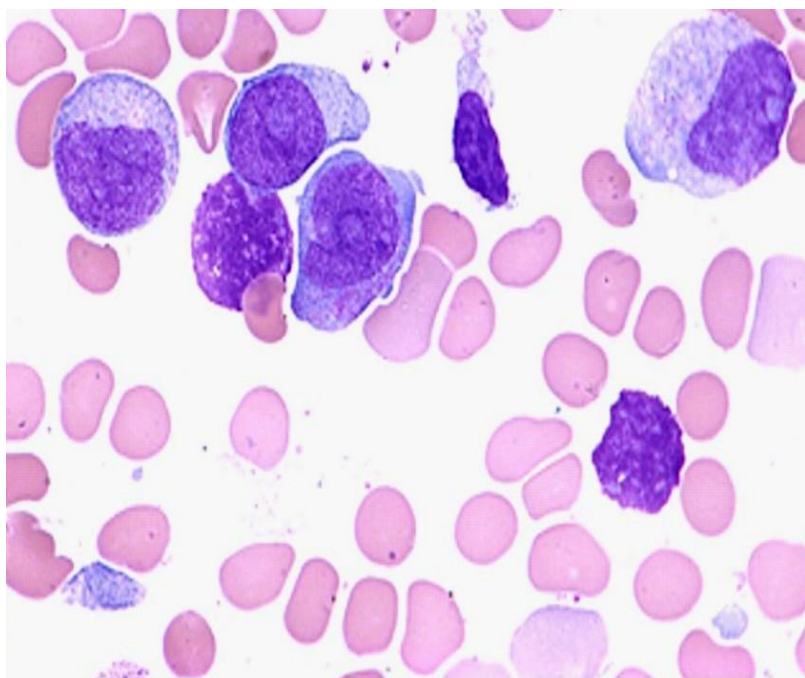


Рис. 4.1. Мієлобласти в периферійній крові хворого на ГМЛ.

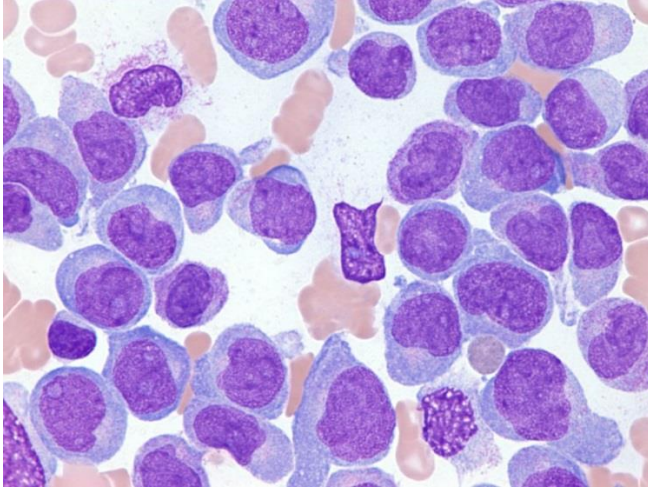


Рис. 4.2. Препарат червоного кісткового мозку хворого на ГМЛ.

Основний механізм патогенезу включає заміну нормального вмісту кісткового мозку клітинами лейкемічної лінії, що призводить до падіння кількості еритроцитів, тромбоцитів і нормальних лейкоцитів у периферійній крові. Діагностика, як правило, базується на біопсії кісткового мозку та специфічних дослідженнях крові — в першу чергу цитологічних, імунологічних, методів проточної цитометрії, цитогенетичних, біохімічних тощо. ГМЛ має декілька підтипів, для яких лікування та його результати можуть бути різними.

ГМЛ, переважно, спочатку лікується хіміотерапією з метою індукції ремісії. Потім хворі можуть отримувати додаткову хіміотерапію, променеву терапію або трансплантацію стовбурових клітин червоного кісткового мозку. Конкретні генетичні мутації, наявні в ракових клітинах, можуть бути визначальними для вибору стратегії терапії, а також визначати час життя хворого, прогноз перебігу захворювання, імовірність рецидиву. При

лікуванні ГМЛ свого часу пробували застосовувати триоксид миш'яку.

У 2015 році на ГМЛ захворіло близько мільйона людей, 147 000 смертей внаслідок нього відбулося у всьому світі. ГМЛ найчастіше трапляється у літніх людей. Чоловіки страждають частіше, ніж жінки. На сьогодні ГМЛ виліковується приблизно у 35 % людей віком до 60 років і 10 % у віці старше 60 років. Люди похилого віку, чие здоров'я занадто слабке для інтенсивної хіміотерапії, мають типову виживаність 5–10 місяців. На ГМЛ припадає приблизно 1,8 % смертей від раку в США.

Оскільки першопричиною виникнення ГМЛ є мутація протоонкогену і виникнення злоякісного клону клітин, то ризик виникнення ГМЛ посилюється дією іонізуючого випромінювання, хімічних мутагенів різної природи, біологічних мутагенів (у тому числі вірусів). Високий ризик виникнення ГМЛ є у людей з підвищеним мутагенезом та підвищеною нестабільністю геному, що може бути обумовлена гомозиготністю за мутантними генами, що пов'язані з процесами репарації ДНК. Є низка спадкових синдромів, пов'язаних з генами, відповідальними за репарацію ДНК — синдром Блума, анемія Фанконі і т. д. При ГМЛ злоякісними клітинами є мієлобласти, що не здатні до дозрівання і диференціювання, активно проліферуються, накопичуються в кістковому мозку, витісняючи нормальні кровотворні клітини.

Більшість проявів ГМЛ обумовлені заміною нормальних клітин крові лейкозними клітинами мієлоїдної лінії. Відсутність нормального продукування лейкоцитів робить людей більш сприйнятливими до інфекцій; в той час як самі лейкомічні клітини, що походять від попередників білих кров'яних клітин, не мають здатності боротися з інфекціями. Падіння кількості червоних

кров'яних клітин (анемія) може спричинити втому, блідість і задишку. Нестача тромбоцитів може призвести до гематом або до кровотечі під час незначних травм.

Ранні ознаки ГМЛ часто є невизначеними і неспецифічними і можуть бути подібними до симптомів грипу або інших поширених захворювань. Деякі генералізовані симптоми включають лихоманку, стомлюваність, втрату ваги або втрату апетиту, задишку, анемію, легкі синці або кровотечу, петехії (плоскі, плями з розміром шпильки під шкірою, викликані кровотечею), біль у кістках і суглобах, а також стійкі або часті інфекції.

При ГМЛ зможе спостерігатися збільшення селезінки, але воно є, як правило, легким і безсимптомним. Набряк лімфатичних вузлів рідко зустрічається при ГМЛ, на відміну від гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ). Спостерігається інколи запалення шкіри.

Деякі люди з ГМЛ можуть відчувати набряк ясен через інфільтрацію лейкемічних клітин в тканину ясен. Рідко першою ознакою лейкемії може бути розвиток твердої лейкемічної маси або пухлини за межами кісткового мозку, яка називається хлорома. Іноді людина може не проявляти симптомів на ранній стадії патогенезу, і ГМЛ може бути виявлений випадково під час звичайного аналізу крові.

Патогенез ГМЛ нерідко пов'язаний з вагітністю. ГМЛ трапляється в 1 з 10 000 вагітних жінок. Наслідки і перебіг в цьому випадку залежать від типу ГМЛ. Гострі лейкемії зазвичай вимагають оперативного, агресивного лікування, незважаючи на значні ризики втрати плоду та виникнення вроджених вад, особливо якщо хіміотерапія проводиться в період чутливого розвитку в першому триместрі.

ГМЛ загалом характеризується гіршим прогнозом перебігу захворювання і результатів лікування, аніж ГЛЛ.

Але загалом ГМЛ вважається виліковним захворюванням, хоча його прогноз залежить від цілої низки факторів.

Найбільш важливими та інформативними вважаються цитогенетичні фактори. Такі мутації як t(8;21), t(15;17), inv(16) вважаються маркерами позитивного прогнозу. При наявності цих мутацій вдається досягти тривалої 5-ти річної ремісії у 70 % пацієнтів. Мутації +8, +21, +22, del(7q), del(9q), inv11q23 вважаються маркерами прогнозу середньої важкості – при наявності цих мутацій вдається досягти тривалої 5-ти річної ремісії в 48 % пацієнтів хворих на ГМЛ. Мутації -5, -7 (анеуплоїдні клони), del(5q), inv 3q вважаються маркерами несприятливого прогнозу – тривалої 5-ти річної ремісії вдається досягти тільки в 15 % пацієнтів.

Похилий вік пацієнтів є негативним прогностичним показником. Так, саме поганими прогностичними показниками вважаються: наявність у пацієнта попередніх інших онкологічних захворювань, проходження хіміотерапії пацієнтом щодо інших онкологічних захворювань, наявність у пацієнта мієлодиспластичного синдрому (МДС) до виявлення ГМЛ. Прогностичний характер різних виявлених онкогенів досі дискутується – дані суперечливі.

ГМЛ – відносно рідкісна форма онкологічних захворювань. Щорічно у Сполучених Штатах спостерігається приблизно 10 500 нових випадків ГМЛ, а рівень захворюваності залишається стабільним з 1995 по 2005 року.

Захворюваність на ГМЛ збільшується з віком; середній вік при діагнозі ГМЛ – 63 роки. ГМЛ становить близько 90% усіх гострих лейкемій у дорослих, але рідко зустрічається у дітей. ГМЛ дещо частіше зустрічається у чоловіків, аніж у жінок співвідношення частоти захворювань в людей різної статі – 1,3 : 1.

Існують певні географічні відмінності в поширенні частоти ГМЛ.



t(9;11)

Рис. 5.1. Одна з хромосомних мутацій, які спричиняють патогенез ГМЛ.

У дорослих найвищі показники частоти ГМЛ спостерігаються у Північній Америці, Європі та Океанії, набагато менші показники частоти ГМЛ у дорослих в Азії та Латинській Америці. Випадки ГМЛ у дітей трапляються рідше в Північній Америці та Індії, ніж в інших частинах Азії. Ці відмінності можуть бути наслідком особливості популяційної генетики цих регіонів, факторів навколишнього середовища або їх поєднання.

На ГМЛ припадає 34 % усіх випадків лейкозу у Великобританії.

5. Хромосомні аномалії при гострих мієлобластних лейкозах

На сьогодні встановлено, що низка хромосомних мутацій зачіпають протоонкогени, спричиняють утворення химерних генів, що викликають онкотрансформацію клітин.

Серед хромосомних мутацій, що спричиняють розвиток ГМЛ, найбільш часто зустрічаються і вважаються первинними наступні хромосомні мутації:

- $t(8;21)(q22;q22)$ з утворенням онкогену RUNX1/RUNX1T1
- $inv\ 16(p13;q22)$ з утворенням онкогену CBFB/MYH11
- $t(15;17)$ з утворенням онкогену APLK
- $t(6;9)(p23;q34)$ з утворенням онкогену KPN1 або DEK-NUP214
- $del\ 16q$ з утворенням онкогену CBFB/MYH11
- $del\ 11q$ з утворенням онкогену MLL
- $t(9;11)(p22;q23)$ з утворенням онкогену C-ALB або MLLT3-MLL
- $t(11;19)$ з утворенням онкогену MLL-ENL
- $t(1;22)(p13;q13)$ з утворенням онкогену BCR або RBM15-MKL1
- $inv(3)(q21;q26.2)$ з утворенням онкогену RPN1-EVI1
- $t(3;3)(q21;q26.2)$ з утворенням онкогену RPN1-EVI1

6. Негоджкінські лімфоми: історія дослідження та загальна характеристика патології

Лімфоми – група онкологічних захворювань системи кровотворення, ракові клітини яких розвиваються з

лімфоцитів. Термін «лімфома» стосується саме онкологічних захворювань, а не будь-яких новоутворень, що виникають у лімфатичній системі. Симптоматичними ознаками патогенезу лімфом є збільшення лімфатичних вузлів, лихоманка, сильне потовиділення, зменшення ваги, постійне відчуття втоми. Збільшені лімфатичні вузли переважно безболісні. Потовиділення переважно відбувається під час сну. Існує багато різновидностей лімфом. Їх розділяють умовно на дві групи: хвороба Годжкіна (ХГ) та негоджкінські лімфоми (НГЛ). Крім цих категорій лімфом виділяють ще дві категорії: множинна міелома та імунопроліферативна хвороба. Лімфоми споріднені з лейкозами і складають разом з ними споріднену широку групу онкологічних захворювань лімфоїдних та кровотворних тканин. Факторами ризику лімфоми Годжкіна є зараження вірусом Епштейна-Барр та спадковість. До факторів ризику поширених типів неходжкінських лімфом належать спадковість, аутоімунні захворювання, ВІЛ/СНІД, зараження вірусом Т-лімфотропів людини, імунодепресанти, пестициди, мутагени різних класів. Наркоманія та тютюнопаління також можуть підвищити ризик захворювання. Діагностика базується на біопсії лімфатичних вузлів. Аналіз крові, сечі та кісткового мозку також може бути корисним для діагностики. Використовують рентгенівську фотографію для в'ясування поширення пухлинного процесу. Лімфоми найчастіше дають метастази в легенях, печінці та мозку. Лікування включає хіміотерапію, променеву терапію, цільову терапію та хірургію. У деяких випадках негоджкінських лімфом настільки збільшена кількість білка в сироватці крові (який виробляється клітинами лімфоми), що це призводить до сильного згущення крові, тоді для видалення надлишкового білка проводять плазмафорез. Результат лікування залежить від

підтипу лімфоми. При інтенсивному лікуванні вдається досягти тривалої 5-ти річної ремісії при лімфомі Годжкіна в 85 % захворювань, а при негоджкінських лімфомах у 69% захворювань.

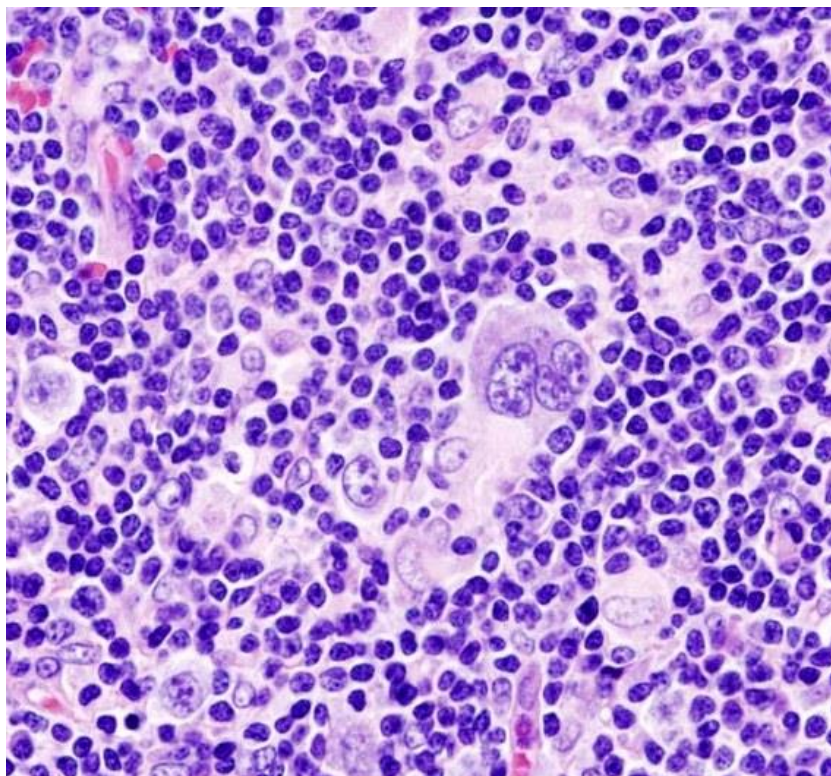


Рис. 6.1. Препарат біопсії хворого на хворобу Годжкіна.

Лімфоми складають 3 – 4% від усіх ракових захворювань, що робить їх сьомою групою за частотою серед усіх онкологічних захворюваннях. У дітей лімфоми є третіми за частотою онкологічними захворюваннями.

Для точної діагностики лімфом використовують біопсію з подальшим імунофенотипуванням та проточною цитофлуориметрією.

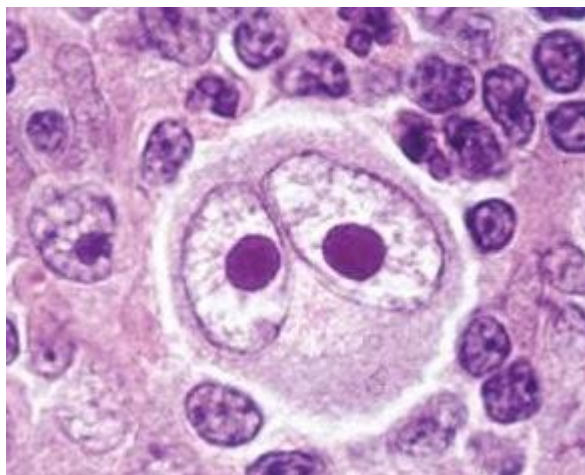


Рис. 6.2. Клітини Ріда-Штернберга (RSC), типові для лімфоми Годжкіна.

При лімфомах клон онкотрансформованих лімфоцитів поширюється по лімфатичній системі, але може потрапляти в кров чи навіть в червоний кістковий мозок – відбувається лейкомізація лімфоми. Тому лімфоми і лейкози вважають спорідненими захворюваннями і називають інколи Т-клітинний лейкоз/лімфома. Існують різні класифікації лімфом, особливо негоджкінських, з врахуванням Т чи В типу попередників ракових клітин, місце утворення пухлинного процесу.

Годжкінська лімфома або **хвороба Годжкіна** або **лімфогрануломатоз (ХГ)** переважно спричиняється вірусом Епштейна-Барр. Розрізняють дві форми лімфоми Годжкіна: класичну форму (90 % випадків ХГ) та форму

нодулярних предромінантних лімфоцитів (НПЛ-ГЛ) (10 % випадків ХГ).



Томас Годжкін (Thomas Hodgkin)
(1798 – 1866)

Першим описав лімфому, яка названа була на його честь
лімфоною Годжкіна

Діагноз хвороби Годжкіна базується в першу чергу на біопсії лімфатичних вузлів, зачеплених пухлинним процесом.

Характерними клітинами для лімфому Годжкіна є клітини Ріда-Штернберга – ракові клітини крупних розмірів, часто двоядерні з імунофенотипом CD45-, CD30+, CD15+/-.

Вважається, що в 50 % випадків клітини Ріда-Штернберга виникають в результаті враження лімфоцитів вірусом Епштейна-Барр. Ці клітини великих розмірів (до 50 мкм), мають рясну дрібнозернисту або однорідну цитоплазму та два ядра, що розташовані дзеркально і нагадують візуально очі сови. Кожне ядро з еозинофільним ядерцем і товстою ядерною мембраною (хроматин розподіляється близько до ядерної мембрани). Майже всі ці клітини мають збільшене число копій хромосоми 9p / 9p24.1. Є варіанти ракових клітин при лімфомі Годжкіна: 1) одноядерні – атипові мононуклеарні, з чисельними ядерцями, з еозинофільною цитоплазмою, що створює лакуни навколо ядра; 2) плеоморфний з кількома ядрами; 3) маленька клітина з компактним ядром та маленькими ядерцями; 4) компактне ядро без ядерця.

Новітні методи хіміотерапії дозволяють досягти тривалої 5-ти річної ремісії в 98 % хвороби Годжкіна зі сприятливим прогнозом і 85 % з несприятливим прогнозом. Несприятливими прогностичними показниками є вік, IV стадія хвороби, чоловіча стать, погані клінічні та біохімічні показники крові.

Лімфому Годжкіна вперше описав і дослідив британський лікар Томас Годжкін (1798 – 1866). У 1832 році він опублікував працю «Про деякі хворобливі прояви абсорбуючих залоз та селезінки» де описав і дослідив 7 випадків хвороби. Проте сам Годжкін не вважав себе першовідкривачем – він стверджував, що перші описи цієї

хвороби належать Марчелло Мальпігі, які цей дослідник здійснив ще в 1666 році.

У 1856 році Семюел Вілкс незалежно від Годжкіна, не знаючи про його роботу, описав низку випадків захворювання. Брайт повідомив Вілксу про дослідження Годжкіна, і в 1865 році була опублікована праця, де цю патологію назвали хворобою Годжкіна. Теодор Лангханс та В. С. Грінфілд вперше описали мікроскопічні характеристики лімфоми Годжкіна у 1872 та 1878 роках відповідно. У 1898 та 1902 роках Карл Стернберг та Дороті Рід незалежно описали цитогенетичні особливості злоякісних клітин лімфоми Годжкіна, які тепер називаються клітинами Рід-Штернберга. Лімфома Годжкіна стала одним з перших онкологічних захворювань, яке досить успішно лікували за допомогою променевої терапії, а згодом ця патологія була однією з перших, яку лікували комбінованою хіміотерапією.

Негоджкінські лімфоми (НГЛ) – група онкологічних захворювань, що охоплює всі інші лімфоми, крім хвороби Годжкіна. Симптоми НГЛ включають збільшені лімфатичні вузли, лихоманку, пітливість під час сну, втрату ваги та хронічну втому. Можуть мати місце біль у кістках, біль у грудях. Деякі форми НГЛ повільно збільшують пухлинну масу, інші навпаки – інтенсивно. Ракові клітини НГЛ виникають з лімфоцитів. До факторів ризику належать спадковість, опромінення, дія мутагенів, імунodefіцит, аутоімунні захворювання, інфекція *Helicobacter pylori*, гепатит С, ожиріння та враження вірусом Епштейна-Барр. Виділяють п'ять основних груп лімфом, включаючи одну з форм як лімфому Годжкіна. У межах чотирьох груп НГЛ існує понад 60 специфічних типів лімфом. Діагностика встановлюється шляхом дослідження біопсії кісткового мозку або лімфатичного вузла.

Першопричиною негоджкінської лімфоми вважається мутація протоонкогена в клітинах лімфоцитів, що вже перебувають в лімфатичній системі, з подальшою онкотрансформацією і отриманням різного рівня злоякісності. Негоджкінські лімфоми частіше зустрічаються в похилому віці, у дітей пік імовірності захворювання припадає на вік до 5 років. Загалом, у дітей 7 % онкологічних захворювань складають негоджкінські лімфоми.

Найчастіше розрізняють наступні типи негоджкінських лімфом:

- 1) лімфобластні Т-лімфоми (Т-LBL);
- 2) лімфобластні В-лімфоми (рВ-LBL);

Ці дві форми лімфом виникають з незрілих попередників Т та В лімфоцитів. Загалом, ці дві групи лімфом складають до 35 % НГЛ.

3) зрілі В-клітинні лімфоми – виникають з популяції зрілих В-лімфоцитів. Ця форма лімфом складає понад 50 % випадків НГЛ;

4) анаплазовані крупноклітинні лімфоми (ALCL) – ця група складає до 15 % випадків НГЛ.

Крім цієї класифікації застосовують ще наступну класифікацію негоджкінських лімфом:

- мляві (невисокий ризик) В-клітинні лімфоми;
- агресивні В-клітинні лімфоми (середній ризик);
- дуже агресивні В-клітинні лімфоми;
- мляві (невисокий ризик) Т-і НК-клітинні лімфоми;
- агресивні Т-і НК-клітинні лімфоми (середній ризик);
- дуже агресивні Т-і НК-клітинні лімфоми.

Лікування залежить від того, чи є лімфома повільно- або швидкопрогресуючою та, чи є одна локалізація пухлинного процесу чи в багатьох областях. Лікування може включати хіміотерапію, променеву, імунотерапію,

цільову терапію, трансплантацію стовбурових клітин, оперативне втручання. Якщо кров стає надмірно густою через велику кількість антитіл, може застосовуватися плазмафорез. Однак променева та хіміотерапія збільшують ризик виникнення інших онкологічних захворювань.

При інтенсивній терапії імовірність досягнення тривалої 5-ти річної ремісії складає 71 %.

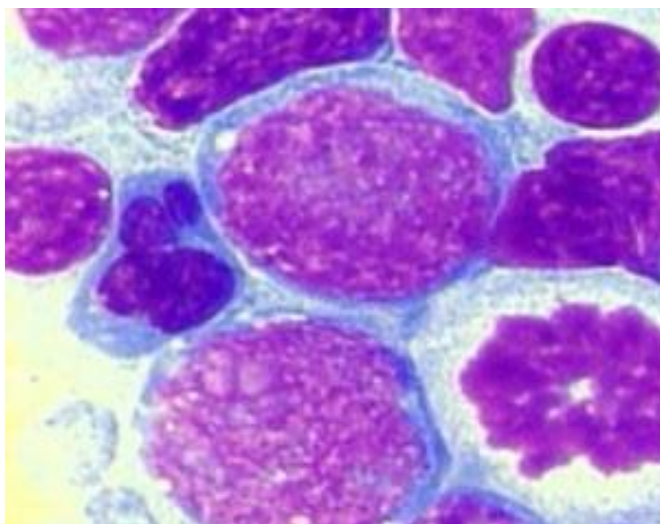


Рис. 6.3. Цитологічний препарат пухлини крупноклітинної форми негоджкінської лімфоми.

Загалом вважають, що негоджкінські лімфоми дуже споріднені з лімфобластними лейкозами і викликані тими самими мутаціями – як генними так і хромосомними. Навіть стратегії лікування НГЛ та ГЛЛ схожі, особливо, коли має місце процес лейкемізації – перетворення негоджкінської лімфоми в лейкоз.

Однією з форм негоджкінської лімфоми є лімфома Беркітта. Ця лімфома має дуже високий рівень

злякисності, утворюється з В-лімфоцитів, часто поширюється за межі лімфатичної системи, здійснюючи лейкемізацію і перетворюючись на лейкоз. Онкотрансформація може початися з дії на В-лімфоцити вірусу Епштейна-Барр або відбутись в результаті мутації клітинного протоонкогену. Без лікування лімфома Беркітта швидко прогресує і призводить до смерті пацієнта. Цей різновид лімфом вперше був описаний Денісом Беркіттом у 1958 році в Уганді. Ця лімфома складає 2,3 % усіх лімфопроліферативних захворювань.

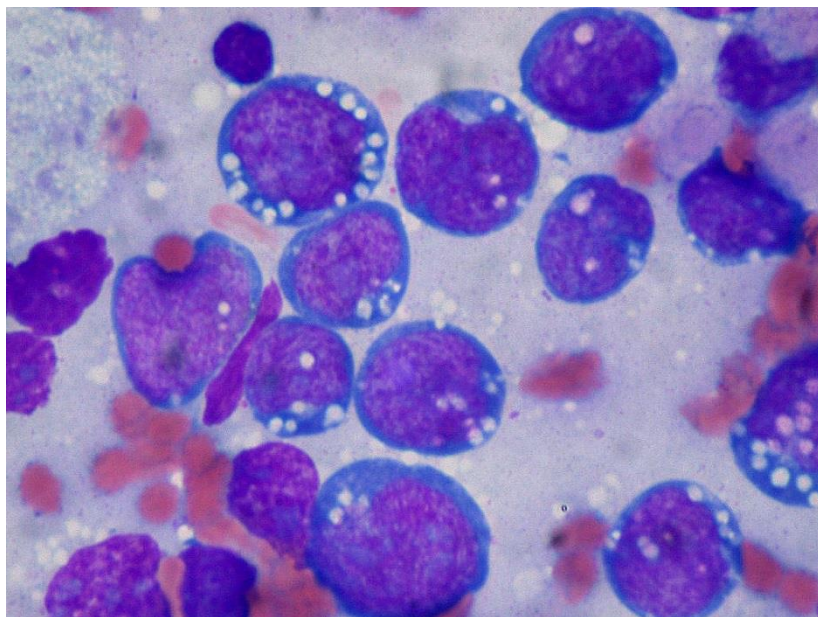
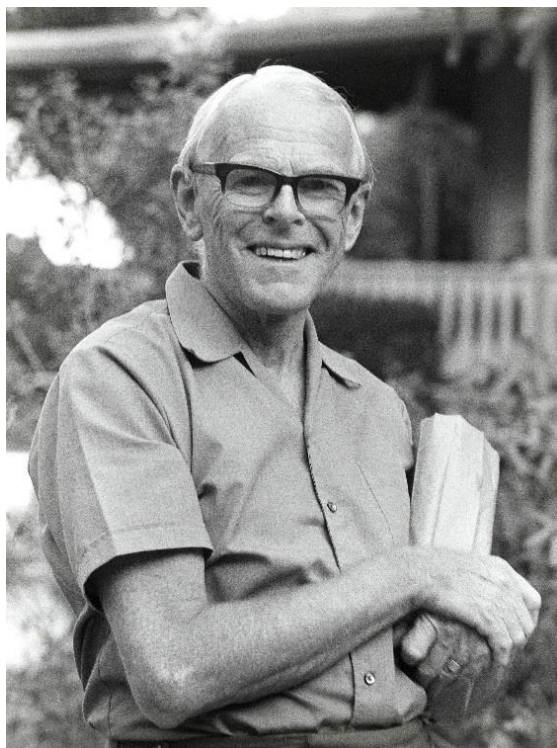


Рис. 6.4. Цитологічний препарат лімфоми Беркітта.

Лімфома Беркітта може розвинути у будь-якому віці, але частіше трапляється в молодих чоловіків. З усіх

країн планети Земля найчастіше трапляється в центральній Африці.



Деніс Парсонс Беркітт (Denis Parsons Burkitt)
(1911 – 1993)

Першовідкривач лімфоми Беркітта

Для всіх варіантів лімфоми Беркітта характерна наявність клітинного онкогену с-тус чи відповідно вірусного онкогену v-тус, які ідентичні.

Клітинний онкоген с-тус може утворюватись в результаті різних транслокацій, які зачіпають довге плече 8 хромосоми, область 24 – 8q24. Саме там локалізований

протоонкоген *c-myc*. Найпоширеніший варіант такої транслокації – $t(8;14)(q24;q32)$ – виявлений в 85 % досліджених випадків лімфоми Беркітта.

У цій транслокації крім гена *c-myc* зачіпається ген *IGH*. Інший варіант транслокації, що викликає лімфому Беркітта, охоплює одразу три хромосоми – $t(8;14;18)$. Рідкісний варіант – транслокація $t(2;8)(p12;q24)$. Під час цієї транслокації зачеплені гени *IGK* та *c-myc*. Ще один рідкісний варіант – $t(8;22)(q24;q11)$ – зачеплені гени *IGL* та *c-myc*.

При патогенезі неходжкінських лімфом часто спостерігається активація протоонкогена *c-myc* в онкотрансформованих клітинах. Перетворення протоонкогена *c-myc* в онкоген може відбутися внаслідок хромосомної мутації. При неходжкінських лімфомах зафіксовані хромосомні мутації, які вважають невідповідними і первинними:

- $t(8;14)$
- $t(2;8)(p11;q24)$
- $t(8;22)(q34;q11)$

При останніх двох транслокаціях ген *c-myc* об'єднується з локусом легких ланцюгів імуноглобулінів. При першій транслокації ген *c-myc* об'єднується з локусом важких ланцюгів імуноглобулінів.

При різних формах неходжкінських лімфом виявлені різні перебудови протоонкогена *c-myc*. Так, при лімфомі Манка та лімфомі BL-18 утворюються нові точки старту транскрипції протоонкогена, що розташовані в середині інтрону. При цьому може відбутися об'єднання гена *c-myc* з регуляторними послідовностями імуноглобулінів. Виявлено, що при лімфомі Беркітта у 7 з 9 випадків точкові мутації відбуваються в одній і тій же ділянці зв'язування регуляторного фактора MIF.

Сучасні методи інтенсивної терапії лімфоми Беркітта дозволяють досягти 90 % тривалої ремісії пацієнтів.

7. Ідіопатична гіпопластична анемія: історія дослідження і характеристика патології

Ідіопатичну гіпопластичну анемію на сьогодні вважають формою ідіопатичної апластичної анемії. Захворювання вперше було описано Паулем Ерліхом у 1888 році в 21-ти річної жінки. Термін «апластична анемія» запропонований Чауфордом у 1894 році. Апластична та гіпопластичні анемії – важкі форми порушення гемопоезу.

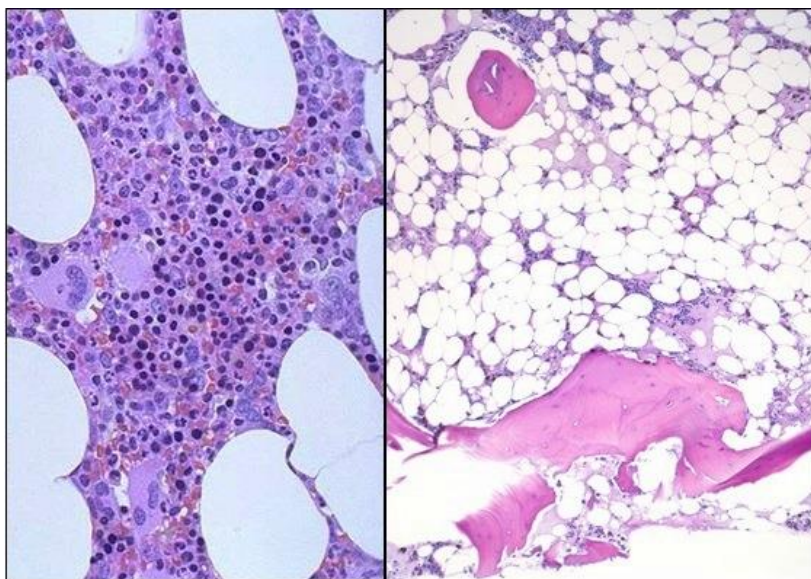


Рис. 7.1. Гістологічні препарати червоного кісткового мозку у нормі (зліва) і хворого на ідіопатичну апластичну анемію (справа).

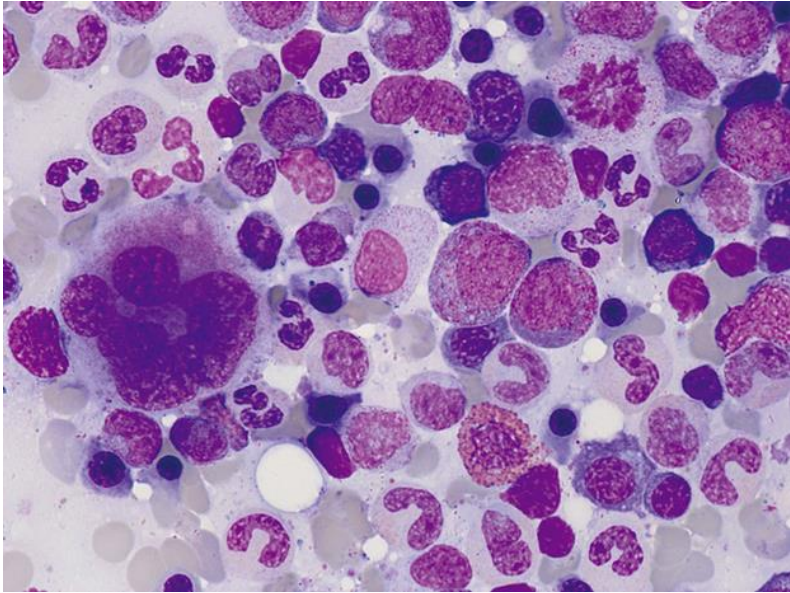


Рис. 7.2. Цитологічний препарат червоного кісткового мозку в нормі. Наявні стовбурові клітини та клітини різних ліній гемопоезу. У хворих на ІГПА кількість цих клітин занижена.

Патогенез захворювання полягає в тому, що пригнічуються всі лінії гемопоезу, відбувається загибель стовбурових клітин червоного кісткового мозку, деградація тканини червоного кісткового мозку та її заміщення на сполучну та жирову тканини. Зменшується кількість всіх формених елементів крові – еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, розвивається анемія, імунодефіцит, порушення згортваності крові. Без лікування хворі на важкі форми апластичної та гіпопластичної анемії гинуть протягом кількох місяців. При сучасному адекватному лікуванні прогноз

позитивний. Довгий час гіпопластична анемія розглядалась як синдром, що об'єднує різні патологічні стани червоного кісткового мозку з вираженою гіпоплазією кровотворення з проявом процесів, які являються самостійними патологіями червоного кісткового мозку.

Дуже часто причина патогенезу гіпопластичної анемії лишається абсолютно неясною і загадковою. Іноді називають окремі причини патогенезу гіпопластичної анемії, зокрема:

1. Дія токсичних хімічних речовин (миш'яку, важких металів, бензолу та ін. токсичних, зокрема, цитостатичних речовин).
2. Іонізуюче випромінювання.
3. Дія фармакологічних препаратів (мерказоліл, цитостатики, анальгін, левоміцетин).
4. Інфекційні агенти (віруси).
5. Аутоімунні процеси (синдром Шегрена).
6. Передлейкозний стан.
7. Генетичні патології (синдром Фанконі, синдром Естрена-Дамешека, синдром Блекфена-Дасмонда).

Проте часто випадки гіпопластичної анемії неможливо пояснити жодним із наведених вище механізмів. Тоді, коли всі ці причини патогенезу виключені, цю патологію називають ідіопатичною гіпопластичною анемією (ІПА).

Апластична анемія та її форма – гіпопластична анемія може розвиватися при дії низки цитотоксичних та мієлотоксичних факторів: іонізуючого випромінювання, хімічних речовин – бензолу, солей золота, миш'яку, лікарських засобів – хлорамфеніколу, левоміцетину, фенілбутазону, бутадіону, хлорпромазіну, аміназину, мепробанату, диплатину, антиметаболітів (6-меркаптопурину, метатрексату), алкілюючих сполук (циклофосфану, хлорбутину) та багатьох інших хімічних

сполук аналогічної дії. Мієлотоксичний ефект від дії одних факторів (іонізуюче випромінювання, антиметаболіти) виникає завжди при доволі високих дозах, дія інших факторів – суворо індивідуальна.

Причина індивідуальної чутливості, зокрема, до деяких медичних препаратів часто абсолютно не зрозуміла, але судячи по всьому пов'язана з генетичними дефектами кровотворних клітин, зокрема стовбурових клітин червоного кісткового мозку. Це стосується, наприклад, дії хлорамфеніколу, фенілбутазону та ін. препаратів, що викликають супресію (в залежності від дози) еритропоезу, зокрема, чи гемопоезу взагалі з частотою 1 : 24 000 та 1 : 40 000 особин, що приймали ці препарати. Спадковий характер індивідуальної чутливості еритропоетичних клітин до цих медичних препаратів підтверджується розвитком аплазії кісткового мозку в різних членів однієї сім'ї та в монозиготних близнюків. У інших випадках ймовірний зв'язок індукованого медичними препаратами пригнічення кровотворення з імунними механізмами появи антитіл до еритроцитарних попередників. Описані випадки виникнення апластичної чи гіпопластичної анемії після гострого вірусного гепатиту (можливо, внаслідок здатності вірусу гепатиту змінювати каріотип клітин, що було простежено на культурі лейкоцитів) чи перенесеної інфекції вірусу Епштейна-Барр чи дії парвовірусів.

Існують спадкові форми апластичної та гіпопластичної анемії, наприклад, анемія Фанконі.

Але більш ніж у половини хворих не вдається виявити ніяких причинних факторів – це так звана ідіопатична апластична чи відповідно ідіопатична гіпопластична анемія. Механізми, що лежать в основі ідіопатичної форми апластичної чи гіпопластичної анемії, неясні. Можливий аутоімунний механізм, що пов'язаний з

дією на клітини червоного кісткового мозку аутоантитіл з участю імунних лімфоцитів. Показано, що лімфоцити (Т-супресори) хворих гальмують утворення еритроцитарних колоній червоного кісткового мозку донора і можуть порушувати диференціацію та проліферацію гематопоетичних клітин-попередників.

Вважається, що основою апластичної чи гіпопластичної анемії може бути враження (внутрішній дефект) стовбурової клітини червоного кісткового мозку, про що свідчить відновлення кровотворення в хворих після трансплантації їм алогенного червоного кісткового мозку. Але суть цих клітинних дефектів лишається неясною, так само і їх первинність. Можливо, що при різних формах апластичної та гіпопластичної анемії патогенетичні механізми різні.

Клінічними проявами аластичної та гіпопластичної анемії є:

1. Анемічний синдром (запаморочення, зниження працездатності, хронічна втома, блідість шкіряних покривів та слизових оболонок, підвищена інтенсивність серцебиття, проблеми щодо фізичного навантаження та ін.).
2. Геморагічний синдром (кровотечі, схильність до діapedезів, геморагії та ін.).
3. Імунодефіцит і пов'язані з ним інфекційні ускладнення.

Діагностика апластичної та гіпопластичної анемії базується в першу чергу на картині периферійної крові хворого. У пацієнтів, хворих на апластичну та гіпопластичну анемію, спостерігається тромбоцитопенія. Зниження рівня гемоглобіну може досягати критичного для життя рівня і складати 20 – 30 г/л. Кольоровий показник переважно рівний одиниці, але інколи спостерігається гіперхромія та макроцитоз еритроцитів.

Кількість ретикулоцитів різко знижена. Характерна для хворих чітко виражена лейкопенія, агранулоцитоз. Абсолютний вміст лімфоцитів може бути і не змінений, але часто занижений. Кількість тромбоцитів завжди занижена, інколи не вдається їх виявити взагалі. ШОЕ збільшене до 40 – 60 мм/год.

Клінічна картина захворювання дає можливість сформувати первинне уявлення про патогенез системи крові. Висхідною точкою діагностичного пошуку є кількісне вивчення крові з визначенням показників ретикулоцитів та тромбоцитів. Виявлення бі- чи трицитопенії при дослідженні периферійної крові служить основою для виконання морфологічних досліджень червоного кісткового мозку.

Діагноз апластичної і гіпопластичної анемії встановлюється на основі типової гістологічної картини червоного кісткового мозку, отриманої методом трепанобіопсії кісток. Для отримання якісного та інформативного біоптату використовуються трепани, що випускаються промислово.

Під час гістологічних досліджень червоного кісткового мозку у пацієнтів спостерігається високий вміст жирової тканини, вміст якої в кістковому мозку може досягати 90 %. Серед домінуючої жирової тканини зустрічаються стромальні та лімфоїдні елементи. Гематогенні клітини представлені вкрай мало: в невеликій кількості зустрічаються еритроїдні та гранулоцитарні попередники. Мегакаріоцити відсутні.

Лікування апластичної та гіпопластичної анемії являє собою дуже складну проблему. Основним і єдиним патогенетичним методом лікування апластичної та гіпопластичної анемії, який би дозволяв розраховувати на збереження життя хворого, є трансплантація кісткового мозку від сумісного донора.

Якщо неможливо підібрати донора, то проводиться паліативна терапія. Вона основана на наступній схемі. У ролі базисного препарату використовується імунодепресант циклоспорин А. У хворих на неважкі форми гіпопластичної анемії використання цього часто є успішним. Крім цього, використання циклоспорину А доцільно з тої точки зору, що глюкокортикоїди, андрогени та антилімфоцитарний глобулін здатні покращити стан гемопоезу в хворих на неважку форму гіпопластичної анемії, але при цьому треба враховувати ризик розвитку клональних захворювань червоного кісткового мозку. Застосування циклоспорину А зменшує такий ризик до мінімуму. У хворих на неважку форму гіпопластичної анемії, що подолали 6-місячний поріг виживання, може настати спонтанне покращення, якщо навіть не проводилось ніякої імуносупресивної терапії. Ефект від імуносупресивної терапії в хворих на важкі форми апластичної та гіпопластичної анемії сумнівний.

Всі хворі на апластичну та гіпопластичну анемію потребують замісної трансфузивної терапії еритроцитарною і/або тромбоцитарною масою. Об'єм трансфузійної терапії визначається показниками периферійної крові та клінічними проявами захворювання. Крім того, проводиться антибактеріальна та мікостатична терапія з метою профілактики або лікування інфекційних ускладнень.

Ремісію вдається отримати приблизно в половини хворих. Прогноз дещо кращий у дітей, ніж у дорослих. Наявність великої кількості жирової тканини в кістковому мозку не свідчить про незворотність процесу. Бувають випадки, коли і в таких хворих настає повна ремісія і повна репарація кровотворення. Прогноз кращий, коли збільшений вміст ретикулоцитів, коли в червоному кістковому мозку є більш поліморфна картина, коли є

невелике збільшення розмірів селезінки, коли є невеликий, але чіткий ефект від кортикостероїдних гормонів.

У цих випадках спленектомія має часто хороший ефект аж до повного одужання. У частини хворих апластична та гіпопластична анемія є передлейкозним станом і є початком гострого лейкозу. Інколи ознаки гемобластозу виявляються лише через кілька років від початку захворювання.

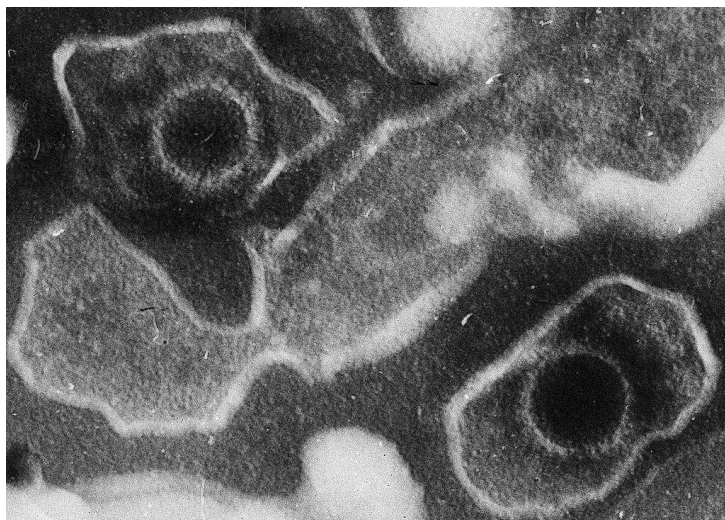


Рис. 8.1. Мікрофотографія віріонів вірусу Епштейна-Барр. Круглі захисні білкові капсули оточені мембраною.

8. Вірус Епштейна-Барр

Оскільки кожна із зазначених вище патологій, що були обрані модельними для вивчення зв'язку функціонування центромери і онкогенезу можуть бути спричинені дією вірусу Епштейна-Барр, то слід хоча б в загальних рисах сказати кілька слів про цей вірус.

Вірус Епштейна-Барр або герпесвірус людини типу 4 один із вірусів, що належить до підродини гамагерпесвірусів родини герпесвірусів. Його геном являє собою дволанцюгову ДНК, вірус в процесі свого розвитку не має стадії РНК. Цей вірус здатний успішно розмножуватись в культурі клітин лімфом, мононуклеарів, лімфобластах різних гострих лейкозів, в культурі клітин головного мозку здорових людей. У багатьох людей зараження вірусом Епштейна-Барр проходить безсимптомно і не має серйозних наслідків для здоров'я. При зараженні клітин цей вірус (на відміну від багатьох інших герпесвірусів) не викликає загибель клітин, а навпаки, активує їх проліферацію. Віріони включають антигени: капсидний – VCA, ядерний – EBNA, ранній – EA, мембранний – MA. Вірус названий на честь вірусологів Майкла Ентоні Епштейна та Івонни Барр, що описали цей вірус в 1964 році. Цей вірус вважається одним із найпоширеніших вірусів в популяціях людини – вважається, що 95 % людей у світі інфіковані вірусом Епштейна-Барр. Питання тільки в тому, чому в одних випадках інфікування цим вірусом не має практично ніяких наслідків, а в інших випадках наслідки фатальні чи навіть летальні.

9. Феномен передчасного розділення центромер – загальна характеристика явища

Феномен передчасного розділення центромер (ПРЦ) полягає в тому, що центромери метафазних хромосом розділяються передчасно, і вже на стадії метафази ми спостерігаємо розділені хроматиди – або окремих хромосом або всіх хромосом метафазної пластинки.

Цей феномен вперше був виявлений ще у 60-тих роках ХХ століття і на початку його вважали артефактом

культури клітин. Але потім було виявлено, що цей феномен набагато частіше зустрічається при різних патологіях – онкологічних захворюваннях, анеміях, хронічному алкоголізмі, розсіяному склерозі та інших захворюваннях (особливо спадкових), аніж у контрольній групі нормальних здорових людей.



Рис. 9.1. Феномен ПРЦ у хворих на ГЛЛ. Стрілкою показано хромосоми, в яких центромери розійшлися передчасно.

Пізніше, у 90-тих роках стали розрізняти явище С-анафази або передчасної анафази, при якому всі

центромери розходяться передчасно і феномен ПРЦ, при якому тільки в окремих хромосомах центромери розділилися передчасно. Вважається, що це принципово різні явища з різними механізмами і різним біологічним значенням. Молекулярні механізми ПРЦ та С-анафази досі лишаються невідомими.



Рис. 9.2. Феномен С-анафази в клітинах периферійної крові в хворого на ГЛЛ.

Феномен передчасного розділення центромер (ПРЦ) досі лишається недостатньо дослідженим. З цим явищем

дослідники почали стикатися ще на початку інтенсивних досліджень в галузі цитогенетики, тобто наприкінці 1960-тих років. Так, з цим феноменом зіштовхнулись Гес К. (Heath C.) та Кіоссоглоу Е. (Kiossoglou E.) у 1965 році, досліджуючи хворих на мегалобластну анемію, виникнення якої пов'язують з дефіцитом фолатів та вітаміну В12.

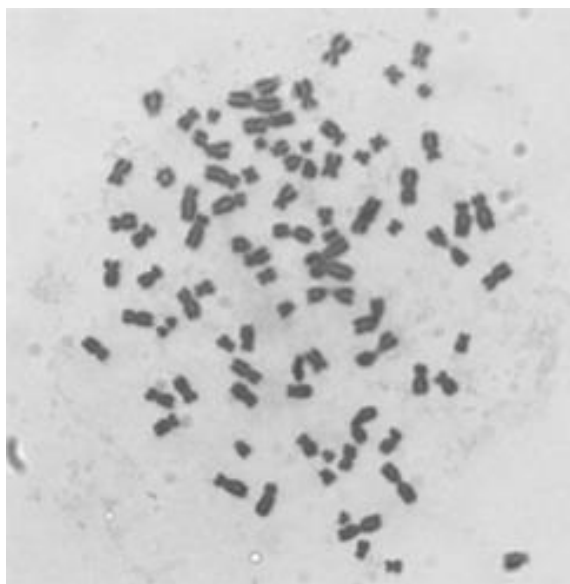


Рис. 9.3. Поліплоїдний набір хромосом в клітинах периферійної крові в хворого на ГЛЛ.

Але в той час феномену ПРЦ не приділили ніякої уваги і вважали його чисто випадковим або культуральним ефектом, свого роду артефактом. Лише в окремих роботах у 1970-тих роках дослідники зауважили, що цей феномен має місце, але систематичних досліджень проведено не було. Зацікавлення феноменом ПРЦ дослідники виявили

лише в 1980-тих роках, коли було показано, що феномен ПРЦ пов'язаний з низкою патологій, у тому числі онкологічних [99, 154].

Передчасне розділення центромер – ПРЦ (premature centromere division – PCD) – це явище, при якому на стадії метафази сестринські хроматиди вже є розділені в ділянці центромери, але сестринські хроматиди продовжують утримуватись поруч, відтворюючи цілісну хромосомну структуру, але при цьому втрачається характерна Х-подібна конструкція, притаманна для метафазних хромосом [181 – 185]. ПРЦ-клітиною вважають таку мітотичну клітину, в якій передчасно розділились центромери однієї або декількох хромосом, тоді як решта хромосом зберігають характерну Х-подібну метафазну структуру [106, 276 – 279] (Рис. 9.1).

Розрізняють дві різновидності ПРЦ – повне (С-анафаза) і часткове (власне ПРЦ). При частковому ПРЦ у феномен задіяні переважно від 1 до 10 хромосом, інколи до 22 хромосом, а при С-анафазі в феномен задіяні від 50 до 100 % хромосом. Повне і часткове ПРЦ вважаються принципово різними явищами з різними механізмами і різним біологічним значенням і розглядаються окремо. Явище повного ПРЦ в літературі називають передчасною анафазою або С-анафазою (С-anaphase) (далі в тексті повне ПРЦ позначається як С-анафаза) [175].

Істинні молекулярно-генетичні механізми ПРЦ та С-анафази лишаються досі невідомими, але припускається зв'язок цих явищ з низкою процесів, що відбуваються в живій клітині [40, 42]. Деякий час вважалося, що феномен ПРЦ є дефектом однієї або декількох центромер, а С-анафаза вважалося чисто культуральним ефектом [106]. Але пізніше було доведено, що ПРЦ та С-анафаза явища не випадкові і обумовлюються не культуральним ефектом, а складними біохімічними і молекулярно-генетичними

механізмами [106, 276 – 279]. Було виявлено зв'язок явищ ПРЦ та С-анафази з дефіцитом фолієвої кистоти та фолатів. Було здійснено припущення, що феномен ПРЦ пов'язаний з процесом метилювання ДНК: фолієва кислота та фолати є донорами метильних радикалів в процесі метилювання ДНК [45]. Було висунуто припущення про зв'язок феномену С-анафази з резистентністю до колхіцину [74], але на сьогодні вважається, що це лише поодинокий окремий випадок причини виникнення С-анафази [106]. Новий інтерес до явищ ПРЦ та С-анафази з'явився спочатку в 1990-тих роках, а потім на початку 2000 років. Накопичилось багато нових фактів про невідповідний характер ПРЦ та С-анафази і на сьогодні вважається, що це не два конкретних явища з конкретними механізмами, а низка різних явищ, що мають однаковий фенотипічний прояв і причинами цих явищ є певні порушення функціонування когезиного комплексу, а саме в функціональній неактивності одного з компонентів когезиного комплексу [202]. Але, імовірно, існують крім цього інші фактори, в тому числі протейнової природи, що пов'язані з функціонуванням центромери, які досі не ідентифіковані, але порушення роботи яких викликає появу феномену ПРЦ [209].

10. Проліферація та онкогенез

Однією з головних властивостей онкотрасформованих клітин є їх здатність до інтенсивної проліферації. Власне, отримання клітинами здатності до неконтрольованої нескінченної проліферації вважають поворотним пунктом онкогенезу. Тому вивчення проліферативної активності клітин є одним із ключів розуміння онкогенезу та шлях подолання цієї медичної проблеми. Живі клітини, в тому числі клітини червоного

кісткового мозку і периферійної крові є високоорганізованими структурами Всесвіту, в якому загалом постійно збільшується ентропія. Живі клітини постійно зменшують ентропію в клітині, так і утворюючи організовані надклітинні структури, що теж постійно зменшують ентропію, використовуючи при цьому енергію. Перебуваючи в стані активної взаємодії з навколишнім середовищем, ці клітини постійно перебувають під впливом різних негативних факторів і впливів, які призводять до ушкодження клітин, зношування субклітинних структур та клітин в цілому та передчасному старінню клітин. Тому кожна окрема клітина (особливо диференційована і тим паче перманентна) рано чи пізно приречена на загибель. Щоб організм в цілому продовжував жити, чи окремі його органи та тканини, такі як червоний кістковий мозок, продовжували успішно функціонувати, організм в цілому змушений виробляти нові клітини з тою ж самою (як мінімум) швидкістю, з якою гинуть старі клітини. Тому процес поділу клітин, контроль за нормальним процесом поділу, регуляція процесу поділу клітин – це життєвоважливі питання для всього організму. У людини мільйони клітин повинні ділитися кожену секунду для підтримки status quo [6].

Процес активного поділу клітин називають **проліферацією**. Низка життєво необхідних і важливих процесів в організмі і низка різних патологічних процесів безпосередньо пов'язані проліферацією та її регуляцією. Одним із таких патологічних процесів, власне, і є процес онкотрансформації.

Більша частина компонентів клітини синтезується протягом всієї інтерфази – періоду між послідовними мітозами. Це утруднює поділ інтерфази на більш дрібні етапи чи періоди. Виключення становить тільки синтез ДНК, оскільки саме ДНК клітинного ядра синтезується

тільки в певний період, що складає тільки частину інтерфази. Це спонукало до поділу інтерфази на частини: період синтезу ДНК отримав назву фази S клітинного циклу. Фаза клітинного поділу – мітозу – отримала назву М. Період між фазою М та початком синтезу ДНК позначили як фазу G_0/G_1 , а період між завершенням синтезу ДНК і мітозом позначили як фазу G_2 . Переважно інтерфаза включає не менше 90 % часу всього клітинного циклу. Так, у клітинах червоного кісткового мозку людини інтерфаза триває в середньому 22-24 години, а фаза М триває не більше 1 години часу [6].

Якщо на одноклітинні організми, зокрема на бактерії, діє потужний селективний тиск, що змушує кожен клітину рости і ділитися якомога швидше, інтенсивність поділу при цьому лімітується в основному наявністю і кількістю поживних речовин в середовищі, то в багатоклітинних організмів, зокрема в людини, різні типи клітин по-різному реалізують свої можливості швидкого поділу, в результаті чого кількість клітин кожного типу лишається на рівні, оптимальному для всього організму. Те саме стосується і клітин червоного кісткового мозку та периферійної крові. Це пояснюється запрограмованим альтруїзмом кожної окремої клітини чи групи клітин: важливе виживання всього організму, а не окремих клітин чи популяцій клітин. У результаті всі 10^{13} клітин людського організму діляться з різною швидкістю. Деякі клітини, такі як еритроцити чи деякі інші високоспеціалізовані клітини периферійної крові в зрілому стані втрачають здатність до поділу. Інші клітини, наприклад, стовбурові клітини червоного кісткового мозку діляться швидко і безперервно протягом всього життя цілого організму. Але більшість клітин людського організму займають проміжне положення – вони можуть ділитися, але роблять це рідко. Довжина клітинного циклу – час генерації – складає для різних

клітин від 8 годин до 100 діб і більше. Але для багатьох клітин червоного кісткового мозку людини клітинний цикл триває біля 24 годин. Основна відмінність між клітинами, що діляться швидко і повільно, полягає в довжині часового проміжку, протягом якого вони перебувають у фазі G_0/G_1 клітинного циклу. Деякі клітини діляться дуже повільно, залишаючись у фазі G_0/G_1 багато днів чи навіть багато років. І що цікаво, час від початку фази S до кінця мітозу на диво постійний і не корелює з темпом поділу клітин [6].

Набагато точніше можна виміряти параметри клітинного циклу в клітин, що ростуть у культурі, де їх легко можна контролювати і вимірювати, обмежуючи надходження необхідних поживних речовин або білкових факторів росту, додаючи невелику кількість інгібіторів білкового синтезу або збільшуючи щільність культури. У всіх цих випадках клітинний цикл зупиняється на фазі G_1 : певно, якщо клітина пройшла цю фазу, то вона вже не може не пройти також і фази S, G_2 , M. Як показали досліди, в кінці фази G_0/G_1 є певний момент, після якого повернення в фазу G_0/G_1 неможливе. Цей момент отримав назву точки рестрикції (точки R). Після того, як клітини минають її, вони неминуче завершують цикл, проходячи його зі звичайною швидкістю, незалежно від зовнішніх умов [6]. Звичайно, все вищесказане не стосується таких специфічних інгібіторів, які зупиняють синтез ДНК – в цьому випадку зупинка клітинного циклу відбувається в фазі S.

Для вимірювання довжини кожної фази клітинного циклу вимірюють спочатку довжину всього циклу конкретних клітин. Для цього в гомогенній популяції культивованих клітин періодично підраховують число клітин під мікроскопом і визначають час, необхідний для подвоєння загального числа клітин (замість підрахунку клітин можна визначити їх загальну масу). Для визначення

довжини фази S використовують методику додавання міченого тритієм тимідину. Частка клітин з міченими атомами приблизно рівна частці фази S у всьому клітинному циклі. Довжину фази M визначають шляхом визначення мітотичного індексу – частки клітин, що містять у конкретний момент часу конденсовані хромосоми (цю величину заведено називати мітотичним індексом). У всіх подібних дослідженнях використовують невеликі поправки, оскільки в безперервно проліферуючій популяції клітин завжди більше молодих клітин, аніж старих (якщо відносний вік клітини відраховують від останнього поділу). Оскільки одна клітина, розділившись, перетворюється на дві молоді клітини, то в ранній фазі G_1 знаходиться вдвічі більше клітин, аніж у пізній фазі M. Визначення довжини фаз G_0/G_1 та G_2 завдання більш складне, бо довгий час дослідники не могли знайти способу вибірково мітити клітини, що знаходяться у цих фазах. Вирішити цю та багато інших проблем дослідження клітинного циклу допомогли методи синхронізації культури клітин з подальшим визначенням проміжків часу між фазами.

Справжній переворот у вивченні проблем клітинного циклу здійснив метод лазерної проточної цитофлуориметрії, що набув з початку 1990-тих років великої популярності в різних галузях цитології, генетики, імунології, гематології, онкології, молекулярної біології. У проточному цитофлуориметрі клітинну суспензію пропускають через вузький отвір зі швидкістю кількох тисяч клітин за секунду і оптичні вимірювання проводяться з кожною окремою клітиною. Під час аналізу клітинної популяції клітини фіксують, що призводить до зупинки поділу чи клітинного циклу і робить клітинні мембрани проникними. Потім клітини обробляють барвником, який може давати флуорисценцію лише у

зв'язаному з ДНК стані. Інтенсивність флуорисценції таким чином прямо пропорційна вмісту ДНК в клітині. Пропускаючи клітини через аналізатор, можна швидко визначити відносну яскравість флуорисценції великого числа клітин, а тим самим і відносний вміст в них ДНК. Клітини з найменшим вмістом ДНК знаходяться в фазі G_0/G_1 , клітини в фазах G_2 та M містять удвічі більше ДНК, а в фазі S – проміжну кількість. Довжину фаз G_0/G_1 , S , G_2 , M легко визначити за часткою клітин, що потрапляють в кожен з цих груп [6, 29, 30, 109, 116, 207]. Вищеописаний підхід також був застосований для низки інших досліджень клітин, зокрема, для дослідження явища апоптозу, про що буде сказано нижче.

Досі лишається невідомо – від чого залежить, чи пройде клітина через точку рестрикції R у фазі G_0/G_1 та чи увійде клітина в новий клітинний цикл. Згідно із сучасними уявленнями, для того, щоб клітина пройшла точку R і почала синтез ДНК, стала готуватись до поділу, в ній повинно відбутись накопичення тригерного протеїну U . Оскільки цей гіпотетичний протеїн нестабільний, його концентрація може стати достатньою для запуску клітинного циклу тільки в тому випадку, якщо він буде синтезуватись порівняно швидко. У фазі M , коли синтез білків дуже незначний, концентрація U -протеїну різко падає і знову досягає порогового рівня в фазі G_1 . Така модель з участю тригерного протеїну, можливо занадто спрощує дійсну картину, але вона може бути корисна для інтерпретації поведінки клітин. Згідно із цією моделлю будь-які умови, що знижують загальну інтенсивність білкового синтезу, повинні віддаляти накопичення порогової концентрації U -протеїну, продовжувати фазу G_0/G_1 і приповільнювати темп поділу клітин. Дійсно, коли клітини ростуть *in vitro* в присутності різних концентрацій інгібіторів білкового синтезу, клітинний цикл

розтягується, тоді як час, необхідний для проходження фаз S, G₂, M, суттєво не змінюється. Продовження фази G₀/G₁ добре узгоджується з передбаченнями, що витікають з цієї моделі, що кожна молекула U-протеїну лишається активною в клітині лише кілька годин. Ця модель дозволяє пояснити гальмування росту клітин при голодуванні або збільшенні їх щільності – як відомо, обидва ці фактори знижують синтез білків і зупиняють клітинний цикл у найбільш чутливій точці фази G₀/G₁ – точці R [6].

На основі цієї моделі можна пояснити дію специфічних факторів росту, які індукують поділ лише визначених чутливих до них клітин. Слід відмітити, що клітини, зупинені в точці R, перестають не тільки синтезувати ДНК і ділитися, але і рости. Але це означає, що в них повністю припиняються біосинтетичні процеси. Зокрема, нормальний розпад (або колооберт) білків у клітинах людини настільки інтенсивний, що швидкість синтезу білку в клітинах, які перебувають в стані спокою, повинна складати не менше ніж 20 % від її швидкості у клітинах, що ростуть, лише для того, щоб підтримати status quo [6].

Очевидно, механізми, які контролюють ріст клітин у тканині, діють безпосередньо на загальну інтенсивність білкового синтезу в клітинах. Згідно із цією гіпотезою, при відсутності специфічних стимулюючих факторів (та/або при наявності інгібуючих факторів) клітини будуть синтезувати білки лише на деякому підтримуючому рівні. При цьому кількість білків з середньою швидкістю оновлення буде підтримуватись на тому ж рівні, що і в клітинах, які ростуть, а концентрація дуже нестабільних білків (включаючи гіпотетичний U-протеїн) буде зменшуватись пропорційно зменшенню швидкості їх синтезу. З іншого боку, при умовах, що допомагають пришвидшенню загального білкового синтезу, кількість U-

протеїну перевищить пороговий рівень, що дозволить клітинам пройти точку рестрикції R і почати процес поділу [6].

Культивовані клітини, цикл яких зупинений в точці R , довгий час лишаються життєздатними і здоровими, навіть якщо їм не вистачає багатьох поживних речовин. Причому, клітини, приречені на голодування в інші моменти циклу, як правило, гинуть. Це дозволяє висунути гіпотезу, що механізми регуляції росту, які включають специфічну точку рестрикції, могли виникнути в тому числі і тому, що клітинам, яким із-за умов існування або взаємодії з іншими клітинами необхідно перестати ділитися, потрібна безпечна точка зупинки (точка R). Про клітини, які зупинені в цьому стабільному стані, часто говорять, що вони вступили в фазу G_0 клітинного циклу.

Основною альтернативою моделі з тригерним білком є модель «ймовірнісного переходу». Ця модель запропонована для пояснення результатів спостережень за допомогою відео клітинних клонів, що ростуть в одноманітних умовах в культурі. Хоча такі клітини генетично ідентичні, вони сильно відрізняються одна від одної довжиною клітинного циклу. Типовий розподіл по цьому параметру мав такий вигляд, наче б то час клітинного циклу регулювався якоюсь стохастичною подією. Тобто, для кожної клітини існує деяка постійна ймовірність пройти точку рестрикції (точку R), що не залежить від того, скільки часу пройшло з моменту останнього поділу. Перехід клітини в фазу S є в цей момент випадковим процесом, що аналогічний радіоактивному розпаду нестабільних ізотопів. Але значний розкид по довжині клітинного циклу не протирічить і біологічно більш обґрунтованій моделі з тригерним білком, бо навіть генетично ідентичні клітини,

що знаходяться в фазі G_1 , можуть сильно відрізнятись між собою за швидкістю білкового синтезу.

Клітинний поділ в тканинах контролюється невідомими механізмами, які дозволяють клітинам ділитися в тому і тільки в тому випадку, якщо необхідні клітини для надклітинної системи в цілому. Наприклад, клітини, що знаходяться в спокої, такі як гепатоцити – клітини печінки, починають швидко ділитися після видалення частини цього органу. Вони перестають ділитися, як тільки маса цього органу знову досягне норми. Такого ж роду обмежувальний поділ клітин спостерігається в шкірі після поранення. Без регуляції клітинного поділу за принципом зворотнього зв'язку багатоклітинний організм швидко б загинув внаслідок надшвидкого поділу клітин (як це буває при онкологічних захворюваннях, таких як гострий лімфобластний лейкоз), або внаслідок надмірної загибелі клітин шляхом апоптозу чи фізіологічної смерті клітин. Аналогічні регуляторні механізми необхідні для впорядкування розвитку клітин і тканин під час ембріогенезу [27].

Коли фібробласти людини культивують у штучному середовищі, вони прикріплюються до поверхні чашки, розпластуються по ній і починають ділитися. Цей процес триває до того часу, поки не утвориться суцільний шар товщиною в одну клітину. У цей момент, коли не лишається вільного місця, нормальні клітини перестають ділитися. Описане явище заведено називати «контактним гальмуванням». Якщо суцільний моношар пошкодити голкою таким чином, щоб на чашці утворилася вільна від клітин зона, клітини на краях цієї зони починають просуватися на вільне місце і ділитися.

Але термін «контактне гальмування», не відображає суті справи. В інших дослідах рівень розпластування клітин контролювали, змінюючи адгезивні властивості

поверхні, на якій росли клітини, а не щільність культури. Отримані результати наводять на думку, що суттєвими факторами, від яких залежить поділ клітин у культурі, є не контакт клітин одна з одною, а рівень їх розпластування. Навіть при відсутності клітинних контактів, чим менше розпластані клітини, тим більше часу займає їх клітинний цикл [6].

Заокруглення клітин супроводжується зниженням загальної інтенсивності білкового синтезу. Тому вищеописані досліди можна інтерпретувати і на основі гіпотези тригерного протеїну. А саме: коли клітини контактують між собою, це обмежує для них можливість розпластатися на субстраті, що призводить до зменшення швидкості синтезу білків, включаючи гіпотетичний U-протеїн. У результаті концентрація U-протеїну в клітині падає і відбувається зупинка клітин у точці R фази G_1 . Клітини по краю «рани» звільняються від подібного інгібування, бо під час їх розпластування синтез білків у них посилюється, що призводить до підвищення концентрації U-протеїну до порогового рівня. Причина того, що зміна форми клітин веде до зміни синтезу протеїнів, є очевидно ріст співвідношення поверхні клітини до її об'єму, що відбувається при розпластуванні. Можливо, що синтез протеїнів прискорюють перебудови цитоскелету, які завжди відбуваються при ущільненні клітин [6].

Якщо висновки зі спостережень за клітинами в культурі можна перенести на клітини в тканинах, то одним із факторів, що контролюють поділ клітин в організмі, може бути наявність контакту між сусідніми клітинами, що обмежує для них можливість розпластатися. Навпаки, наявність порожнього простору, що виникає під час поранення або під час природної втрати клітин (при апоптозі, наприклад) стимулює поділ завдяки тому, що

сусідні клітини розпластуються на цьому просторі. Але це явище не пояснює повністю регуляцію клітинного росту в тканинах і в червоному кістковому мозку, зокрема.

Згідно низки теорій клітинний поділ регулюється в першу чергу позиційними сигналами. Переважно клітини в тканинах діляться тільки в тому випадку, якщо вони знаходяться в певному оточенні, навіть якщо є вільний простір для їх росту. Наприклад, у багат шаровому епідермісі шкіри поділ переважно відбувається лише в одному базальному шарі клітин, що знаходяться на базальній мембрані, яка відділяє їх від дерми. Ці клітини, що діляться, дають початок дочірнім клітинам, які витісняють з базальної мембрани по напрямку до поверхні епідермісу. Внаслідок міграції клітин в цьому напрямку, клітини перестають ділитися і починають утворювати велику кількість кератованих філаментів, які накопичуються в цитоплазмі, утворюючи щільний захисний шар. Якщо базальні клітини ін'єкувати в дерму, що розташована глибше, або навпаки «підняти», щоб вони втратили контакт з базальною мембраною, вони перестають ділитися. Імовірно, епідермальні клітини діляться тільки під час стимуляції певним невідомим фактором, що присутній на межі між дермою та епідермісом. Цим фактором може бути дифундуюча молекула або ж компонент базальної мембрани. Очевидно, процеси аналогічні описаним вище, наявні і в червоному кістковому мозку. Хоча, щодо позиційних факторів, що необхідні для клітинного поділу мало що відомо, але вони можуть, імовірно, мати широке поширення. Наприклад, в ембріональній підшлунковій залозі ссавців для нормального поділу і диференціювання епітеліальних клітин потрібен специфічний білковий фактор, що виділяється підстилаючими клітинами мезенхіми цієї залози. Досліди з трансплантацією тканин виявили складну

картину міжклітинних взаємодій, що контролюють поділ клітин з використанням принципів, які, імовірно, є загальними для багатьох тканин, що розвиваються. Багатьом культивованим клітинам для того, щоб ділитися та вижити, необхідно мізерні кількості (біля 10^{-10} моль/л) специфічних факторів росту. При цьому, клітинам різного типу потрібні різні фактори або їх суміші. Факторами росту можуть бути білки або невеликі молекули типу пептидів або стероїдів. Серед ростових факторів є гормони, циркулюючі в крові, і речовини, що діють на короткій відстані – локальні хімічні медіатори. Можливо, що в низці випадків саме ці медіатори відповідальні за позиційний контроль клітинного поділу в тканинах [6]. Вищеописані механізми контролю проліферації клітин стосуються в першу чергу клітин нормальних. Під час патології чи патогенезу, зокрема, при онкотрансформації клітин ці механізми порушуються.

Найактуальнішою проблемою клітинної біології завжди вважалася проблема пошуків причин онкологічних захворювань, включно з гострими лейкозами та лімфомами, та способи їх лікування. Онкотрансформовані клітини проявляють низку властивостей, що небезпечні для організму в цілому (при цьому ракові клітини можна розглядати як патологічні клітини, що паразитують на організмі господаря). До таких небезпечних властивостей належать здатність до міграції чи проростання в інші тканини і органи (метастазування), стимуляція росту капілярів (що забезпечує раковим клітинам добре кровопостачання). Але чи не головна властивість онкотрансформованих клітин – це аномальна реакція на сигнали, що контролюють поділ нормальних клітин. Пухлинні клітини діляться порівняно безконтрольно до тих пір, доки не вбивають господаря. Ця фатальна відсутність стримуючого фактору є стимулом для

інтенсивних досліджень регуляції клітинного поділу. Хоча істинні молекулярні механізми онкотрансформації та регуляції поділу клітин лишаються досі неясними, очевидно, що поділ пухлинних клітин, як в культурі *in vitro* набагато менше підлягає регуляції за принципом зворотнього зв'язку, аніж поділ нормальних клітин. Наприклад, онкотрансформовані клітини в культурі продовжують ділитися, в той час, як в аналогічних умовах нормальні клітини перестають ділитися із-за контактного гальмування. У результаті ракові клітини наповзають одна на одну, коли не мають вже можливості розпластатися по поверхні культуральної чашки. Крім того, онкотрансформованим клітинам для росту потрібно менше ростових факторів, аніж нормальним клітинам (іноді це пояснюється здатністю пухлинних клітин виробляти власні фактори росту) [6, 7, 8, 9, 14].

Іншою фундаментальною особливістю онкотрансформованих клітин є те, що вони, як клітинна популяція, здатні ділитися необмежено довго, тоді, як нормальні клітини гинуть після обмеженого числа поділів. Наприклад, нормальні фібробласти людини, що ростуть в культурі, діляться в середньому до 50 разів. З часом культура клітин старіє, клітинам потрібно все більше часу для здійснення клітинного циклу, і, зрештою, вся популяція перестає ділитися і гине. Переважно клітини, взяті від старих тварин чи людей, діляться менше число разів, аніж клітини молодих особин. Це означає, що клітини старих особин використали більшу частину свого мітотичного потенціалу, ще знаходячись в організмі. Ці спостереження навели на думку про те, що в процесі свого диференціювання клітини програмуються на загибель після певного числа поділів. Ця запрограмована загибель клітин (фізіологічна смерть клітин або апоптоз), корисна організму як додаткове страхування від неконтрольованого

поділу певної клітини. Тому більшість клітин, що вийшли з-під нормального контролю клітинного поділу, дає початок лише невеликим клонам нащадків, після чого вся аномальна популяція гине. Онкотрансформація – це дещо більше, аніж просте порушення проліферації. Не тільки контроль мітотичної активності і запрограмовані старіння і смерть клітин роблять онкологічні захворювання відносно рідкісними подіями [6, 14, 27, 29]. Важливу роль у розвитку злякисних новоутворень відіграє процес втрати контролю клітиною генетичної стабільності. Низка досліджень, що були здійснені в різні роки, дозволяють стверджувати, що продукти генів p53, Rb, E2F є ключовими компонентами в ланцюгу біохімічних подій, що контролюють стабільність геному. Виявлено, що у відповідь на пошкодження ДНК та інші форми генетичного та генотоксичного стресів експресія гена p53 і біологічна активність відповідного білка швидко підвищуються. Ця активність призводить до зупинки клітинного циклу і/або апоптозу клітин. Саме ця роль протеїну p53 може пояснити той факт, що переважна більшість всіх злякисних новоутворень містять мутантний ген p53 [29].

Відповідно до існуючих уявлень онкотрансформація може відбуватися в результаті генетичних змін (мутацій) в одній єдиній клітині. Ця клональна теорія онкогенезу ще в 1990-тих роках отримала загальне визнання, хоча далеко не всі факти ця теорія успішно пояснює. Суть клональної теорії наступна. Під час мітотичного поділу клітина з генетичними змінами дає початок клону клітин з трансформованим фенотипом. Перш ніж стати пухлинними клітинами, ці клітини переживають чимало змін. Тому онкогенез розглядається як довгий багатостадійний процес, що складається з трьох основних стадій:

- 1) ініціації;
- 2) промоції;
- 3) прогресії.

Клітини в кожній з цих стадій онкогенезу характеризуються певними морфологічними, фенотипічними та біохімічними особливостями [29, 30].

Під час онкогенезу канцерогенні агенти (чи їх активні метаболіти) діють на певні елементи геному клітини-мішені, і цей процес називається ініціацією. При поділі клітини такі пошкодження ДНК можуть фіксуватися в геномі дочірніх клітин. Але це не означає, що всі проліферуючі ініційовані клітини стають злоякісними. Мутації певних генів лише призводять до зміни функцій білків, які вони кодують, що в свою чергу може призвести до зміни властивостей клітин, які є носіями цих мутацій. Але для онкотрансформації недостатньо одиначної мутації, а необхідні зміни в кількох генах – один із цих генів забезпечує іморталізацію (безсмертя) клітин, інший ген – розвиток злоякісного фенотипу. Структурні зміни генетичного матеріалу під час ініціації пухлинного процесу в першу чергу зачіпають протоонкогени і гени-супресори пухлинного процесу, які є нормальними складовими клітинного геному і відповідають за життєво важливі функції клітин. Протоонкогени (коли вони активуються в онкогени) і гени-супресори (коли вони інактивуються) викликають специфічні зміни в характері проліферації, диференціації та апоптозу ініційованих клітин. Багато протоонкогенів кодують структуру цитокінів, їх рецепторів, внутрішньоклітинних білків, що беруть участь у передачі внутрішньоклітинних сигналів, а також факторів транскрипції, що вказує на потенційну роль активації протоонкогенів в індукції ініційованих клітин. Аномальна резистентність до апоптозу таких клітин сприяє їх підвищеному виживанню [30].

Для стадії промоції канцерогенезу характерні клональна експансія ініційованих клітин і подальші зміни в їх геномі. Так формується популяція клітин з геномними пошкодженнями, що передує їх злякисному переродженню. На цьому етапі можливе утворення доброякісних новоутворень. Стадія промоції може здійснюватись під дією екзогенних факторів, які не є генотоксичними канцерогенами. Часто промоція ініціюється ендогенними факторами (наприклад, стимуляція гормонами). Під впливом промоторів, дія яких починається після припинення ініціюючого ефекту канцерогенезу і часто є тканиноспецифічною, в клітинах індуюються плейотропні зміни в їх диференціюванні, проліферації та апоптозі. Дія негенотоксичного промотора полягає в стимуляції проліферації ініційованих клітин, що збільшує розміри популяції клітин з первісною мутацією. При цьому зростає ймовірність вторинної мутації в якійсь із клітин такої популяції, бо проліферуючі клітини більш чутливі до дії мутагенів. Генотоксичні канцерогени можуть проявляти властивості промоторів під час неодноразової дії навіть при низьких концентраціях [29, 30].

Однією з характерних рис промоції є її зворотність. Крім того, дія промоторів має концентраційний поріг [30].

На стадії прогресії відбувається посилення швидкості проліферації клітин, зниження їх диференційного потенціалу, прояв інвазійних властивостей і здатність до метастазування. На стадії прогресії мають місце такі явища, як нестабільність геному і геномні, анеуплоїдні, сегментні хромосомні мутації та аберації (зміни числа наборів хромосом або числа окремих хромосом, розриви хромосом, перебудови хромосом). Процес перебудови хромосом може здійснюватись за допомогою двох механізмів: інтрахромосомного (в одній хромосомі) або

інтерхромосомного (в кількох хромосомах). Давно встановлено зв'язок між інтерхромосомними транслокаціями і визначеними злякисними новоутвореннями, вияснено, які онкогени при цьому утворюються чи/та активуються. Пухлинні клітини змінюються фенотипічно, отримуючи підвищену здатність до проліферації і втрачаючи здатність до повного диференціювання та апоптозної загибелі клітин. Завдяки цьому вони мають переваги перед клітинами нормальних тканин під час росту і виживання в однакових умовах. На стадії прогресії мають місце не тільки глибокі порушення взаємодій між клітинами, але і між пухлиною і організмом [29, 30].

Одним із інструментів для вивчення регуляції клітинного циклу служать онковіруси. Чи не найважливішим результатом досліджень дії онковірусів на процес регуляції клітинного циклу та проліферації клітин є створення клітинних культур, в яких спостерігається неопластична трансформація, вивчення якої *in vivo* пов'язане з величезними труднощами. У чисельних роботах в цій царині було створено різні лінії клітин, що під час інфікування онковірусами трансформуються. Трансформовані клітини легко розпізнаються завдяки змінам у морфології і в умовах, що необхідні для росту клітин. Умови є свого роду селективними маркерами ракових клітин. Деякі важливі відмінності між нормальними і пухлинними клітинами можна узагальнити в наступному списку особливостей культури клітин:

1. Посилення транспорту метаболітів.
2. Посилене продукування активатора плазмогена, що збільшує позаклітинну протеолітичну активність.
3. Посилене утворення міхурців у плазматичній мембрані.
4. Зменшення адгезії до твердих поверхонь і, як наслідок, - збереження округлої форми клітин.

5. Нездатність активованих філаментів до утворення великих пучків.
6. Слабке відкладення фібронектину в позаклітинний матрикс.
7. Ріст незвичайно великої щільності клітин.
8. Занижена вимога до факторів росту, що містяться в сироватці крові.

Вважається, що основними механізмами, якими онковіруси порушують нормальну регуляцію поділу клітин, є наступні:

1. **Інсерція.** Саме тільки включення вірусної ДНК в клітинний геном може змінити структуру або рівень активності найближчих до цього локусу генів клітини господаря. Цей процес отримав назву інсерційного мутагенезу, оскільки такі зміни успадковуються як мутації.

2. **Привнесення вірусного промотора до клітинних протоонкогенів.** Високоактивний вірусний промотор РНК-полімерази II вбудовується поруч з важливим клітинним геном, надлишкова експресія якого призводить до появи пухлинного фенотипу. Оскільки ланцюги мРНК починають синтезуватися на вірусному промоторі, що включений в кодуючу послідовність сусіднього гена, в клітині утворюється ненормально велика кількість цього білка.

3. **Привнесення вірусного онкогена.** Чимало онковірусів містять один або кілька онкогенів, що самі здатні викликати пухлинну трансформацію клітини-господаря.

Процес поділу клітини складається з двох стадій – поділу ядра (мітозу) і поділу цитоплазми (цитокінезу). Але перш ніж клітина зможе поділитися, вона повинна перше подвоїти свою масу і редуплікувати свої компоненти. Тільки в цьому випадку дочірні клітини будуть мати всі

необхідні компоненти для власного клітинного циклу, що знову завершується поділом.

Більша частина компонентів клітини синтезується протягом всієї інтерфази між послідовними мітозами. Виняток складає лише синтез (реплікація) ДНК, що відбувається тільки в певний період інтерфази – фази S. Дослідження мутантних клітин дріжджів показали, що для початку синтезу ДНК необхідно подвоєння структури, що знаходиться на ядерній мембрані – полярного тільця веретена поділу. Аналогом цієї структури в людській клітині є центріоль, що діє як частина важливого центру організації мікротрубочок, тісно зв'язаного з інтерфазним ядром і як компонент кожного з полюсів веретена під час мітозу. Центріоль подвоюється шляхом матричного процесу один раз протягом клітинного циклу. Можливо, що досягнення певної стадії в процесі її подвоєння (як і в випадку полярного тільця в дріжджів) являє собою критичний момент у ланцюгу подій, що ініціюють реплікацію ДНК. Досі не відомо, що служить пусковим сигналом для синтезу ДНК в фазі S – одночасно в багатьох точках геному. Можливо, що синтез ДНК ініціюється в одній певній ділянці хромосоми, запускаючи каскад послідовних процесів ініціації по всьому геному. Так чи інакше, але пусковий механізм працює за принципом «все або нічого», оскільки, почавшись у фазі S, реплікація ДНК продовжується до повного завершення цього процесу. Під час фази S кластери реплікативних вилок активуються одночасно в усіх хромосомах. Місця утворення реплікативних вилок розташовані групами (реплікативними одиницями), в кожен з цих груп входить від 20 до 80 точок початку реплікації. У середині цієї групи точки початку реплікації знаходяться одне від одного на відстані 30 – 300 kb.

Протягом всієї фази S активуються нові реплікативні одиниці, доки не буде реплікована вся ДНК. Більшість реплікативних вилок розташовані парами: двівилки однієї пари рухаються в протилежних напрямках від загальної точки початку реплікації, утворюючи структуру, яку називають реплікативним міхуром. Реплікативнівилки в одиниці реплікації припиняють рух, коли зустрічають сусіднювилку, що рухається в протилежному напрямку. Таким чином ДНК в цій області хромосоми реплікуються, утворюючи дві повні дочірні спіралі. Реплікативнівилки рухаються протягом фази S приблизно з однаковою швидкістю. По ходу реплікації ДНК до складу хроматину включаються гістони. Різні генетичні ділянки в одній і тій же хромосомі реплікуються у фазі S в різний час. Часова організація реплікативних процесів у фазі S визначається структурою інтерфазного хроматину.

У більшості клітин людини деякі ділянки ДНК конденсовані набагато сильніше, аніж інші. Ці ділянки, які називають гетерохроматином, лишаються відносно щільними навіть в інтерфазі, коли хромосоми переходять у більш рихлий стан, в якому вони активно синтезують РНК. ДНК гетерохроматину не транскрибується в РНК, вважається, що підвищений рівень конденсації такого хроматину перешкоджає експресії його генів, якщо вони там є, і ця ділянка не являє собою набір беззмістовних повторів чи так звану «егоїстичну ДНК». Важливе значення для розуміння часової організації реплікативних процесів має той факт, що блоки конденсованого гетерохроматину, в тому числі ділянки поблизу центромери, що лишаються конденсованими протягом всієї інтерфази, реплікуються протягом пізніх етапів фази S. Не виключено, що ділянки ДНК самої центромери лишаються нереплікованими протягом всієї інтерфази і

реплікуються вже безпосередньо під час мітозу – на межі між метафазою та анафазою.

Таким чином, пізня реплікація, очевидно, зв'язана з особливостями упаковки цієї ДНК в хроматині. Важливим прикладом може служити неактивна (репресована) X-хромосома самок ссавців (при наявності двох або більше X-хромосом в каріотипі тільки одна X-хромосома лишається активною, інша/інші перетворюються в глобулу гетерохроматина – тільця Барра). Ця репресована X-хромосома реплікується тільки наприкінці фази S, тоді як реплікація її активного гомолога відбувається протягом всієї фази S. Хоча обидві ці хромосоми мають ідентичні послідовності ДНК, тільки неактивна X-хромосома конденсована в гетерохроматин. Отже, логічно припустити, що порядок, в якому активуються точки початку реплікації, повинен визначатися структурою хроматину в цих ділянках. Очевидно, що першими реплікуються ті точки геному, де хроматин в інтерфазі найменш конденсований і найбільше доступний для реплікативного апарату. Це узгоджується з тим фактом, що багато реплікативних одиниць відповідають окремим смугам хроматину, що виявляються завдяки різним процедурам фіксації і забарвлення, що використовується при каріотипуванні (наприклад, G-, C-, R-забарвлення метафазних хромосом). У гаплоїдному наборі хромосом ссавців можна виявити до 2000 смуг, і кожна така смуга являє собою продукт конденсації (під час мітозу) низки суміжних ділянок ДНК зі схожою структурою хроматину. Той факт, що ці ділянки активуються для реплікації в фазі S як єдине ціле, означає, що хроматин в окремій смужці зберігає свою структурну єдність навіть під час інтерфази. Не виключено, що сусідні ділянки хроматину, які утворюють смуги під час мітозу, також є функціональними одиницями експресії генів. Якщо це так, то процес

диференціації клітин у людському організмі супроводжується тонкими змінами структури окремих хромосомних смуг. Ці зміни могли б у свою чергу грати важливу роль в ембріогенезі, допомагаючи визначати, який набір генів буде експресуватися в клітинах кожного типу під час диференціації. Якщо це справді так, то не виключено, що аналогічні процеси відіграють певну роль і в онкогенезі, зокрема, в онкогенезі гострих лейкозів та лімфом. Не виключено, виходячи з вищесказаного, що саме пізня реплікація відіграє вирішальну роль в процесі розходження центромер в мітозі, особливо, якщо врахувати той факт, що прицентромерні райони являють собою області гетерохроматину, що пізно реплікується в фазі S.

По ходу проходження клітинами фази S активуються все нові точки початку реплікації. Такі сусідні точки в кожній реплікативній одиниці розділені відстанями від 30 до 300 kb. Час, необхідний для завершення синтезу, початого в будь-якій точці, складає від 5 до 50 хвилин. Якщо звичайна S-фаза триває 8 годин, вже десь в середині цієї фази виникає складне завдання, яке пов'язане з тим, що деякі точки початку реплікації до того часу будуть повністю редульковані та ідентичні іншим точкам початку реплікації, які ще не використовувались. Але попри це кожна точка повинна бути використана в фазі S один, і тільки один раз. Хоча молекулярний механізм, що забезпечує лише однократне відтворення ДНК невідомий, загальний принцип вирішення такого роду завдань був розкритий в досліджах щодо злиття клітин. Коли клітини в фазі S зливаються з клітинами у фазі G₁, починається синтез ДНК. Це дозволяє висунути гіпотезу, що перехід з G₁ у S обумовлений дією якогось дифундованого ініціатора синтезу ДНК. У той же час злиття клітин у фазі G₂ з клітинами в фазі S не призводить до ініціації синтезу

ДНК в ядрі, що знаходиться в фазі G_2 , хоча ядро, що знаходиться в S-фазі, продовжує синтезувати ДНК. Це означає, що хроматин у фазі G_2 не може реплікуватися, оскільки з ним міцно зв'язаний якийсь інгібуючий фактор, нездатний до дифузії. Існування такого інгібітора легко дозволило б пояснити однократність реплікації. Подібний інгібітор міг би модифікувати хроматин з ДНК, що подвоїлась, і таким чином перешкоджати її повторній реплікації в тій же фазі S. Так, весь хроматин ядра, що знаходиться в фазі G_2 , блокований інгібітором, його ДНК не здатна до подальшої реплікації навіть в присутності цитоплазми клітин, що знаходяться в фазі S. З іншого боку, інгібітор, очевидно, видаляється під час мітозу або скоро опісля мітозу, бо ДНК ядер, що знаходяться в фазі G_1 , здатна реплікуватися під дією цитоплазми клітини в фазі S.

Клітинний цикл має свою логіку: за час клітинного циклу повинна бути реплікована не тільки ДНК і зв'язані з нею білки. Клітина повинна між двома послідовними поділами подвоїти всі свої компоненти, а значить, і свою масу. Тому і не дивно, що більшість компонентів, на відміну від ДНК, синтезуються протягом всієї інтерфази. Якщо біосинтетичний потенціал клітини збільшується протягом її росту, швидкість синтезу різних компонентів зростає в період від G_1 до G_2 . У клітинах людини з тисяч відомих білків лише деякі синтезуються в певний визначений час клітинного циклу.

Клітини не переходять до мітозу (M), якщо інгібіювати в них синтез білків – навіть у кінці фази G_2 . Це свідчить про те, що якісь білки, які синтезуються в цей період, необхідні для клітинного поділу. Деякі дані щодо можливої природи цих білків були отримані під час дослідів, в яких мітотичні клітини зливали з інтерфазними. У гібридних клітинах хромосоми інтерфазних ядер швидко конденсуються, а оточуюча їх ядерна мембрана

руйнується. Це дозволяє висунути версію, що в пізній фазі G_2 з'являються якісь розчинні фактори, що відсутні в інтерфазних клітинах і необхідні для мітозу. У свій час була висунута гіпотеза, що незадовго до кінця фази G_2 активується розчинна протеїнкіназа (фермент, що каталізує фосфорилування білків), і це призводить до переходу клітин з G_2 -фази в мітоз (М-фазу). Ця кіназа може бути відповідальна за фосфорилування білків ядерної ламіни, що в свою чергу могло бути причиною розпаду ядерної мембрани, який відбувається у фазі М. Крім того, ця кіназа, можливо, забезпечує посилене фосфорилування молекул гістону H1 (до 6 залишків фосфату на молекулу), характерне для мітотичних хромосом. Якщо гістон H1, присутній в кількості однієї молекули на нуклеосому, бере участь у взаємній укладці нуклеосом, інтенсивне фосфорилування перед самим мітозом може бути причиною конденсації хромосом. Таке пояснення, хоча воно і гіпотетичне, може стати ілюстрацією того, в які деталі доводиться заглиблюватись, щоб зрозуміти клітинний цикл у цілому. Але не дивлячись на конденсацію хромосом, при злитті мітотичної клітини з інтерфазною нове веретено поділу не утворюється. Це означає, що істотні частини складного молекулярного механізму мітотичного веретена формуються в пізній фазі G_2 . Фаза G_2 закінчуючись, переходить у профазу мітозу. Профаза – це момент клітинного циклу, коли вперше стають видимі конденсовані хромосоми. Рівень конденсації хромосом під час пізньої фази G_2 зростає поступово, момент початку фази М визначають доволі довільно.

Фаза М у клітинному циклі людини включає надзвичайно складні механічні процеси. Для того, щоб клітина розділилась, потрібно, щоб пройшло дві окремих низки подій:

1. Хромосоми, подвоївшись під час фази S, повинні вишикуватись в одній площині, відділитись одна від одної і розійтись до протилежних полюсів клітин.

2. Повинна розділитись цитоплазма, при цьому таким чином розділитись, щоб кожна з дочірніх клітин не тільки отримала повний набір хромосом, але і була забезпечена необхідними компонентами цитоплазми і всіма органелами.

Хоча ці два процеси – ділення ядра (мітоз) і ділення цитоплазми (цитокінез) – можна розділити, вони, звісно, тісно пов'язані між собою так, що цитокінез починається перед остаточним завершенням мітозу. Необхідність складного механізму мітозу з'являється в процесі еволюції тоді, коли з'явилися клітини з різко збільшеною кількістю ДНК, що упакована в окремі хромосоми. Тоді особливо важливим стало завдання розподілу хромосом, що подвоїлись, між двома дочірніми клітинами за допомогою спеціального мітотичного апарату. Точність, з якою працює мітотичний апарат, була визначена під час дослідів з дріжджовими клітинами, і виявилось, що помилка під час розходження хроматид відбувається 1 раз на 10^5 поділів. Звісно, якщо наявна патологія мітотичного апарату, імовірність похибки зростає на кілька порядків. Цим, очевидно, і пояснюються високий рівень поліморфізму щодо хромосом, висока частота анеуплоїдних, поліплоїдних і гіперплоїдних клонів у популяції онкотрансформованих клітин.

Хоча, є детальні описи структури і функціонування мітотичного апарату в найрізноманітніших клітинах, відомості про молекулярні механізми мітозу ще дуже фрагментарні. Традиційно в мітозі виділяють наступні стадії:

Профаза. Перехід з фази G_2 в фазу M клітинного циклу здійснюється поступово. Хроматин, що в інтерфазі

виглядає дифузним, повільно конденсується в чітко видимі хромосоми. Для кожного виду еукаріот характерна певна кількість хромосом. Кожна хромосома під час попередньої фази S редуплікована і складається тепер з двох сестринських хроматид, що з'єднані між собою центромерою. Під час початку конденсації хромосом ядрця зникають. На початку профазі чисельні мікроплазматичні мікротрубочки, що входять до складу мікроскелету, розпадаються. При цьому утворюється великий пул вільних молекул тубуліну. Ці молекули знову використовуються для побудови головного компоненту мітотичного апарату – мітотичного веретена. Веретено являє собою біполярну волокнисту структуру, що складається в основному з мікротрубочок. Сукупність цих мікротрубочок утворюється спочатку поза ядром. У більшості клітин тварин область, де вперше утворюється веретено поділу, містить центріолі. Наприкінці фази G₁ вихідна пара центріолей починає реплікуватися і в результаті реплікації з однієї пари центріолей утворюється дві пари. Кожна пара центріолей в мітозі стає частиною мітотичного апарату, від якого променями розходяться мікротрубочки. Спочатку обидві ці структури знаходяться біля ядерної мембрани. У пізній профазі пучки полюсних мікротрубочок, що взаємодіють один з одним, подовжуються і ніби розштовхують два мітотичних центра один від одного вздовж зовнішньої поверхні ядра. Таким чином утворюється біполярне мітотичне веретено.

Прометафаза починається з швидкого розпаду ядерної оболонки на дрібні фрагменти, що неможливо відрізнити від фрагментів ендоплазматичного ретикулуму. Ці фрагменти лишаються видимі біля веретена поділу. Веретено поділу, що було розташоване поза ядром, може тепер переміститись в ядерну область. У хромосомах з кожної сторони центромери в прометафазі утворюють

особливі структури, що називаються кінетохорами. Вони прикріплюються до спеціальної групи мікротрубочок, що зветься кінетохорними нитками або кінетохорними мікротрубочками. Ці нитки відходять від обох сторін кожної хромосоми, ідуть у протилежних напрямках і взаємодіють з нитками біполярного веретена. При цьому хромосоми починають інтенсивно рухатись, що пояснюється взаємодією їх кінетохорних ниток з іншими компонентами веретена.

Метафаза. Всі хромосоми в метафазі розташовуються таким чином, що центромери лежать в одній площині. За орієнтацію хромосом перпендикулярно осі веретена і розташування їх на рівній відстані від обох полюсів веретена відповідають кінетохорні нитки. Кожна хромосома утримується в метафазній пластині парою кінетохорів і двома пучками зв'язаних з ним ниток, що йдуть до протилежних полюсів веретена.

Анафаза. Метафаза різко закінчується розділенням двох центромер кожної хромосоми і кожна хроматида починає повільно рухатись до полюсу веретена. Всі хроматиди рухаються до відповідного полюсу з однаковою швидкістю (біля 1 мкм/хв). Під час анафазного руху кінетохорні нитки вкорочуються синхронно з наближенням хромосом до ниток веретена, і два полюси розходяться ще далі. Анафаза, звичайно, продовжується всього лише лічені хвилини.

Телофаза. Коли розділені дочірні хроматиди підходять до полюсів, кінетохорні нитки зникають. Полюсні нитки продовжують подовжуватись, після чого навколо кожної групи дочірніх хроматид утворюється нова ядерна оболонка. Конденсований хроматин починає розрихлюватись, з'являються ядрця, і мітоз завершується.

Цитокінез. Цей процес починається в пізній анафазі або в телофазі. Мембрана в середній частині клітини (між

двома дочірніми ядрами) починає втягуватись в середину площини, що перпендикулярна до довжини осі веретена: утворюється борона поділу, яка поступово поглиблюється, доки не дійде до вузького залишку мітотичного веретена, що розташоване між двома дочірніми ядрами. Цей місток (залишкове тільце) може існувати деякий час, після чого звужується, а потім і повністю руйнується. У результаті утворюються повністю розділені дочірні клітини.

Але тільки частина подій в мітозі пов'язана з функціонуванням мітотичного веретена. Колхіцин пригнічує залежне від мітротрубочок розташування хромосом і розходження їх до протилежних полюсів. Але в деяких клітинах, наприклад в клітинах морського їжака, поведінка хроматину і ядерної оболонки після обробки колхіцином не змінюється: конденсація і наступна деконденсація хроматину, розділення двох хроматид в області центромери і всі наступні події мітозу і цитокінезу – всі ці події і при відсутності веретена поділу відбуваються нормально (тоді як в присутності колхіцину можуть відбуватися лише ранні події мітозу і кожна хромосома лишається у вигляді пари конденсованих сестринських хроматид). Досліди з використанням злиття клітин теж дозволяють припускати, що зміни хроматину і ядерної оболонки, що ведуть до метафази, контролюються розчинними факторами, не зв'язаними з мітотичним веретеном: у результаті злиття метафазних та інтерфазних клітин відбувається конденсація хромосом і руйнування ядерної мембрани інтерфазного ядра, а нове ядро не утворюється [6].

11. Аномалії хромосом і онкотрансформація.

З часів відкриття та ідентифікації онкогенів було досліджено багато аспектів онкогенезу – як на хромосомному, так і на генному рівні. Особливо багато робіт стосуються генетики та цитогенетики гострих лейкозів – як лімфобластного, так і мієлобластного гострих лейкозів – ці патології стали одними з модельних об'єктів щодо досліджень онкогенезу – з цілої низки причин (в першу чергу через відносну легкість культивування клітин). У 1980-их та 1990-их роках стався певний прорив в царині генетичних аспектів лейкозів – як теоретичної сторони проблеми онкогенезу, так і практичної. Були розроблені методи точної ранньої діагностики з використанням генетичних маркерів, успішне лікування, досягнення тривалої ремісії, повне видужання – все це стало реальністю, хоча останній з описаних досягнень все ще не досить часто подія [14, 111, 70]. Але ціла низка проблем, аспектів та питань, які стосуються онкогенезу взагалі і онкогенезу гострих лейкозів та лімфом, зокрема, досі лишаються малодослідженими або недослідженими взагалі. Серед цих питань проблемним лишаються причини нестабільності геному при лейкозах (лейкеміях) – нестабільності як однієї з причин лейкозів, так і причин нестабільності мутантних онкотрансформованих клонів. У стрункій теорії онкогенезу гострих лейкозів та лімфом є низка питань, на які досі не дано вичерпної відповіді, низка положень теорії онкогенезу лейкозів досі лишаються гіпотетичними. До малодосліджених феноменів, що супроводжують гострі лейкози, належить і феномен передчасного розділення центромер метафазних хромосом (ПРЦ). Але перш ніж викласти сучасні уявлення про цей феномен, слід розглянути сучасну теорію онкогенезу гострих лейкозів і гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ)

зокрема, викласти сучасні погляди на механізм патогенезу, розвитку та перебігу цього захворювання.

Ця робота присвячена вивченню окремих аспектів онкогенезу на прикладі патогенезу гострих лейкозів та лімфом, зокрема, стосується проблеми пошуків нових цитогенетичних діагностичних та прогностичних маркерів перебігу гострих лейкозів та лімфом. Тому онкогенез гострих лейкозів тут розглядається з генетичної точки зору, багато клінічних аспектів не розглядається. Загалом на сьогодні гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ) визначають як пухлинний процес, основу якого складає гіперплазія патологічного клону клітин з високими проліферативними потенціями лімфоцитарної лінії клітин кісткового мозку [9]. Це захворювання розуміють як дисбаланс процесів проліферації і диференціації в класі стовбурових клітин, при якому вражаються гемопоетичні попередники різного рівня диференціювання: від поліпотентних стовбурових клітин до комітованих попередників лімфопоезу [8]. Будучи крайньою формою патології клітин-попередників, ГЛЛ є природною моделлю для вивчення властивостей стовбурових клітин кровотворення в людини. Багато закономірностей, виявлених в умовах цієї патології, стали основою для створення гіпотез і теорій по клініці гемопоезу в нормі [14]. В умовах чітко окресленого патологічного процесу є особливо цікавим визначення низки факторів, що беруть участь у механізмах розвитку захворювання [8, 9]. Для дослідження різних аспектів і особливостей онкогенезу, клітинного циклу, клітинного росту, цитологічних, цитогенетичних, молекулярно-генетичних аспектів на різних стадіях патогенезу, поглиблене вивчення селективної дії цитостатичних препаратів на різних стадіях життєвого циклу злоякісних клітин дозволяє більш раціонально підійти до проблеми діагностики та лікування

ГЛЛ, до більш раціонального комбінування хіміопрепаратів і в кінцевому результаті до більш ефективного лікування [9, 16].

У 1970-тих роках вивчення проблем патогенезу гострих лейкозів супроводжувалось використанням досягнень фармакології, молекулярної генетики, цитогенетики, цитології, імунології, біохімії. Накопичувалось все більше даних про спадковий характер гострих лейкозів: було продемонстровано, що в сім'ях, де зустрічались випадки ГЛЛ, ризик захворювання на ГЛЛ в 4 рази вищий, аніж в інших групах населення. Було виявлено зв'язок між патогенезом гострих лейкозів та різними відомими хромосомними патологіями – було виявлено, що частота гострих лейкозів зростає при деяких хромосомних патологіях, таких як синдром Дауна і синдром Кляйнфельтера. Так, при хворобі Дауна імовірність захворювання на ГЛЛ зростає у 30 разів. Згідно з даними Дегоса Л. (Degos L.), якщо один з монозиготних близнюків захворів на ГЛЛ, то імовірність захворіти іншому близнюку становить понад 25 %. Багато дослідників прийшли до висновку, що генетичні фактори визначають тільки схильність до ГЛЛ, яка потім реалізується під час дії мутагенів різної природи (фізичної, хімічної, біологічної) [9, 14].

Застосування в гематологічній практиці цитогенетичних методів, особливо методів диференційного забарвлення хромосом, а пізніше методів затримки конденсації хромосом, що розробив Юніс Дж. (Yunis Y.) на початку 1980-тих років, здійснило переворот в дослідженні онкогенезу гострих лейкозів, а в першу чергу онкогенезу ГЛЛ [243]. Дані, отримані цитогенетичними методами, а пізніше і методами полімеразної ланцюгової реакції (PCR), послужили основою для створення сучасної теорії онкогенезу взагалі і

гострих лейкозів та лімфом зокрема. Саме завдяки роботам Юніса Дж. було виявлено, що хромосомні дефекти наявні в 96 % випадків гострих лейкозів та лімфом, і, що переважна більшість цих дефектів (60 %) є стійкими і не випадковими хромосомними аномаліями [243]. Три основних досягнення цитогенетики сприяли цьому відкриттю. Першим досягненням була розробка в 1970 році методу диференційного забарвлення хромосом та їх ідентифікація за індивідуальним малюнком смуг еухроматину та гетерохроматину, що складається з 150 – 320 сегментів. Саме це дозволило розпізнавати аномалії хромосом при лейкозах, в тому числі дрібні сегментні хромосомні мутації (делеції, дуплікації, інверсії та ін.). До цього єдиною відомою аномалією при лейкозах була філадельфійська хромосома (ph^+). Другим досягненням було відкриття того факту, що при лейкозах наявна хромосомна аномалія може і не виявлятися з цілої низки об'єктивних причин (ріст в культурі виключно нормальних клонів та ін.). Третім і найважливішим досягненням була, власне, розробка в лабораторії Юніса Дж. методу метотриксатної синхронізації клітинного циклу в ролі рутинного методу вивчення хромосом при лейкозах по 400, 550, 850, 1000 сегментах хромосом [243]. Цей метод в сукупності з методом затримки конденсації хромосом дозволив отримати більшу кількість мітозів з диференційним забарвленням високої якості, на яких стало можливо виявляти нерозпізнані раніше аномалії хромосом і на більш досконалому рівні визначати специфічні хромосомні ділянки, що відіграють суттєву або визначальну роль в канцерогенезі [112]. До використання методу затримки конденсації хромосом хромосомні аномалії виявлялись лише в 50 % випадках ГЛЛ, і специфічність та первинність їх була під сумнівом. Стійкі хромосомні аномалії виявлялись лише у невеликій частини

пацієнтів. Після застосування цього методу клональні хромосомні аномалії були виявлені в 96 % хворих на ГЛЛ [56, 57, 58, 59, 243].

Сучасна теорія онкогенезу лейкозів має генетично-мутаційну основу (теорія спонтанної мутації). Спонтанні мутації у визначеному локусі, у конкретній хромосомі, визначеній зоні гена, що відповідає за проліферацію і диференціювання певної клітинної лінії, виникають лише за умов підвищеної мутабільності нормальних клітин (або згідно інших уявлень – за умов наявності нестабільних ділянок хромосом, що передаються по спадковості [78, 243]), яка може бути властива певному клітинному пулу в особливий період розвитку (наприклад, коли наявна висока проліферативна активність клітин-попередників імунопоезу у новонароджених дітей і дітей молодшого віку) [7, 8, 9, 14]. У такій популяції, що нараховує 10^5 клітин, продукується $1,8 \cdot 10^{18}$ клітин-попередників лімфопоезу з великою ростовою здатністю. Згідно частоти спонтанних мутацій ($10^5 - 10^6$ на кожний клітинний цикл), з'являється можливість розвитку 2-3 випадків лейкозних клонів, що відповідає частоті гострих лейкозів у дітей [9].

Підвищений рівень мутабільності може бути викликаний спадковою нестабільністю генетичного апарату, вірусним, радіаційним, хімічним чи іншими факторами [6]. Далі властива патологічному клону з цієї мутованої клітини хромосомна нестабільність призводить до повторних мутацій і формування злякисних автономних клонів і пухлинної прогресії, поліморфізму онкотрансформованих клітинних популяцій і субпопуляцій. В онкогенезі ГЛЛ особливу роль відіграють механізми природної резистентності і стабільності генотипу, що може мати значення в розробці профілактики гострих лейкозів. Не менш важливими є і імунологічні аспекти онкогенезу гострих лейкозів та проблема

природної елімінації мутантних і мутагенних клонів клітин. На думку Альбертса Б. зі співавторами питання зараз стоїть: не чому і як виникають гострі лейкози, а чому вони виникають так рідко [6]. Прогрес в області цитології, морфології і функціональної гематології дозволяє досить точно уявити собі механізми порушення кровотворення при гострих лейкозах – цитопатогенез гострих лейкозів з кожним роком, з кожним кроком наукових досліджень стає все більш і більш зрозумілим.

Загалом, на сьогодні з'являється все більше фактів, які підтверджують думку, що у кожної людини кожен день з'являються ракові клітини, зокрема лейкозні. Але всі люди не хворіють на лейкози чи інші форми раку – спрацьовують чисельні захисні механізми. Якщо відбувається мутація протоонкогена чи його регуляторної області, то запускаються системи репарації ДНК (їх виявлено цілу низку) – ушкоджена ділянка ДНК повертається в свій початковий стан; якщо це не спрацьовує – діють так звані «молекулярні поліцейські» - молекули, що виводять клітину з клітинного циклу; потім запускається апоптоз – запрограмована смерть клітини; якщо це не спрацьовує – працює імунна система – спеціалізовані клітини-кілери знищують небезпечні чи потенційно небезпечні клітини. І тільки, коли всі ці системи не спрацьовують – починається патогенез відповідної форми онкологічних захворювань. Підвищений ризик захворіти на гострий лейкоз чи лімфому мають люди, які є гомозиготними за мутантними генами, що контролюють певну форму репарації ДНК, апоптоз, синтез «молекулярних поліцейських», мають певну форму імунодефіциту – спадкову чи набуту.

Нині загальновизнаною стала клональна теорія патогенезу гострих лейкозів, згідно з якою гострий лейкоз чи лімфома є наслідком проліферації неконтрольованого

автономного клону клітин, що втратили притаманну їм нормальним здоровим аналогам здатність до диференціювання і дозрівання. З точки зору багатьох авторів утворення лейкозного клону є багатоступінчастим процесом [14]. Висловлюється гіпотеза про існування нестабільних ділянок хромосом, що успадковуються згідно законів Менделя [68, 142]. Якщо локалізація цієї ділянки співпадає з локалізацією протоонкогенів (таких як ABL чи c-myc, зокрема), існує велика ймовірність хромосомної мутації з наступним перетворенням протоонкогена в онкоген чи утворенням химерного гена (такого як E2A-ABL), що також є онкогеном. Тобто початкова подія під час патогенезу ГЛЛ – це патологічна мутація в структурному гені поліпотентної стовбурової клітини, що призводить до утворення клону з нестабільним геномом, що дуже чутливий до мутагенних впливів [243]. Цей клон на початку свого існування правильно виконує всі програми диференціації, маючи лише переваги в рості перед нормальними клонами клітин. У реальності існування такого клону переконують ціла низка робіт та експериментальних моделей культивування кісткового мозку мишей – роботи Мура М. (Moog M.). Про наявність латентного мутантного клону на ранніх стадіях розвитку гострих лейкозів у дітей при відсутності клінічної картини лейкозів свідчать дослідження сидеробластної анемії, панцитопенії та інших патологічних станів, які вважають передлейкозними. Для розвитку гострих лейкозів, тобто для бластної кризи, необхідні, на думку багатьох авторів, додаткові зміни в геномі генетично нестабільного клону, що призводять до спотворення і блокування програм клітинного диференціювання [123]. Репродуктивна здатність такого клону ще більше зростає, він витісняє інші, розвивається типова картина гострого лейкозу – бластна криза. Передіснування генетично нестабільного

клону або нестабільних клітин в різних лініях призводить до утворення різних клонів з різним генотипом і каріотипом (вторинний поліморфізм клітинної субпопуляції). Ці клітини втрачають здатність до подальшого диференціювання [131]. Цей факт пояснює утворення так званих «міксів» - лейкозів мішаного типу, а також заміни одного лейкозного клону іншим при гострих лейкозах та їх бластних кризах. Крім припинення диференціювання, в лейкозному клоні може відбутися спотворення фізіологічного блокування програм диференціювання. При цьому можуть одночасно в мутантних клітинах працювати різні програми, що призводить до розвитку лейкозів-химер і так званих D-клітинних лейкозів [7, 8].

Ріст лейкозної популяції починається з однієї клітини, швидкість росту залежить від багатьох факторів, не всі з яких наразі відомі [160]. Але безсумнівно, що явище апоптозу в цьому процесі займає не останнє місце [248]. Не виключено, що саме збій програми включення апоптозу відіграє вирішальну роль для запуску швидкого росту лейкозної популяції. Коли лейкозна популяція досягне певних розмірів, певної маси, відбувається гальмування диференціювання нормальних стовбурових клітин і різко падає продукція нормальних клітин [16].

Основний постулат концепції багатоетапного утворення лейкозного клону – первинне враження гемопоезу на рівні поліпотентних стовбурових клітин, що роблять поліпотентну стовбурову клітину родовідною лейкозного клону. Потім клон, що містить мутацію чи мутації, витісняє нормальний клон чи нормальні клони клітин [7, 8]. Гіпотезу про утворення рh-хромосоми на рівні стовбурових клітин підтверджують випадки знаходження рh-хромосоми в популяції ФГА-стимульованих лімфоцитів. Але ці випадки є

поодинокими. У більшості випадків rh-позитивних ГЛЛ філадельфійська хромосома не виявляється цитогенетичними методами. І на це є кілька пояснень:

1. Утворення rh-хромосоми - не первинна подія під час виникнення лейкозного клону, відбувається не завжди на рівні стовбурових клітин і тому rh-хромосома виявляється не в усіх клітинах лейкозного клону.
2. Претимусні клітини з rh-хромосомою не можуть ввійти в вилючкову залозу і дати популяцію чутливих до ФГА Т-лімфоцитів.
3. Пул попередників лімфоцитів утворюється зі стовбурової на ранніх періодах її життя, являючись у подальшому самопідтримуючим, більш пізня rh-трансформація стовбурової клітини може призвести до розвитку лімфобластної кризи, але не до появи rh-хромосоми у лімфоцитах – існуючий rh-позитивний клон лімфоцитів співіснує з величезним числом довгоживучих лімфоїдних клітин, що утруднює його виявлення [7].

Слід зазначити, що rh-позитивний ГЛЛ відрізняється від rh-позитивного хронічного мієлобластного лейкозу (ХМЛ) і особливостями каріотипу. Зокрема, при rh-позитивному ГЛЛ часто виявляються нетипові rh-хромосоми або транслокації з 22 хромосомою не 9 хромосомою (як при типовій rh-хромосомі, при типомому ХМЛ). Крім того, описаний ГЛЛ з аномальною подвійною rh-хромосомою. Трапляються випадки ГЛЛ, коли наявна не тільки rh-хромосома, а також інші аномалії хромосом [47].

У більшості випадків Т-ГЛЛ у дітей виявляються маркери претимусових лімфоцитів, що вказує на походження цих клітин від ранніх комітованих попередників Т-лімфоцитів, що розташовані в нормі в кістковому мозку. Лейкемічні популяції Т-ГЛЛ та В-ГЛЛ

несуть у своїх клітинах маркери зрілих, функціонально активних Т- та В-лімфоцитів, що вказує на їх походження зі зрілого пулу лімфоцитів, що знаходяться в лімфатичних вузлах. Це може бути підтвердженням концепції про позакістковомозкове походження більшості Т- та В-ГЛЛ, які, по суті, є лімфомами з ранньою лейкемізацією. Не існує чітких фенотипічних відмінностей між ГЛЛ і лейкемізованими лімфомами [8].

Походження лейкозного клону при ГЛЛ може проходити і за іншими схемами, і може бути не пов'язане безпосередньо з червоним кістковим мозком. Добре відомо, що в лімфатичній системі існують довгоживучі Т- та В-лімфоцити, які, подібно до стовбурових поліпотентних клітин, довгий час можуть знаходитись поза циклом і мають проліферативний потенціал значно вищого рівня, аніж нормальні попередники еритроцитів та гранулоцитів. Ці довгоживучі лімфоїдні клітини можуть стати мішенню для мутагена. Таким чином, враження стовбурових клітин не обов'язкова умова для розвитку ГЛЛ. Походження лейкозного клону з мітогенстимульованих лімфоцитів частіше буває при ГЛЛ у дітей, аніж у дорослих. У цю схему прекрасно вписується той факт, що пік ГЛЛ у дітей (3-5 років) співпадає з піком антигенної стимуляції.

Саме з таким походженням ГЛЛ у дітей пов'язані більш позитивні результати лікування [14].

У результаті цілого ряду досліджень, що тривають і досі, було виявлено цілу низку хромосомних аномалій, що вважаються первинними і не випадковими і які, на думку цілої низки авторів, в тому числі Бергера Р. (Berger R.) та Сандберга А. (Sandberg A.) вважаються причиною початку патогенезу гострих лейкозів.

Таблиця 11.1. Первинні невивадкові хромосомні мутації, що викликають онкогенез різних форм лейкозів.

Мутація	Тип лейкозу	Мутація	Тип лейкозу
t(1;3)(p36;q21)	ГМЛ, МДС	t(7;9)(q35;q34)	Т-ГЛЛ
t(1;7)(p11;q11)	ГМЛ, МДС	t(7;11)(p15;p15)	ГМЛ
t(1;11)(p32;q23)	ГЛЛ	t(7;11)(q35;p13)	Т-ГЛЛ
t(1;11)(p21;q23)	ГМЛ	t(7;14)(q35;q11)	Т-ГЛЛ
t(1;14)(p32;q11)	Т-ГЛЛ	del(8)(q22)	ГМЛ
t(1;17)(p36;q21)	ГМЛ	t(8;12)(p21;q13)	ГЛЛ
t(1;19)(q23;p13)	preB-ГЛЛ	t(8;14)(q24;q11)	Т-ГЛЛ
t(1;22)(p13;q1)	ГМЛ М7	t(8;14)(q24;q32)	ГЛЛ L3
del(2)(p23)	ГМЛ	t(8;16)(p11;q13)	ГМЛ М5
del(2)(p21)	ГМЛ	t(8;21)(q22;q22)	ГМЛ М2
t(2;8)(p12;q24)	ГЛЛ L3	t(8;22)(q24;q11)	ГЛЛ L3
ins(3;3)(q26;q21)	ГМЛ, МДС	i(9p)	ГЛЛ
inv(3)(q21;q26)	ГМЛ, МДС	del(9)(p13-22)	ГЛЛ
t(3;3)(q21;q26)	ГМЛ, МДС	del(9)(q22)	ГМЛ
t(3;5)(q21;q31)	ГМЛ	t(9;11)(p21;q23)	ГМЛ М5, ГЛЛ
t(3;5)(q25;q34)	ГМЛ	t(9;12)(p11;p12)	ГЛЛ
t(3;21)(p14;q22)	ГМЛ	t(9;22)(q34;q11)	ГЛЛ, ГМЛ, ХМЛ
t(2;16)(p11;p11)	ГЛЛ	t(1;4)	ГЛЛ
t(4;11)(q21;q23)	ГЛЛ	t(10;11)(p12;q13)	ГМЛ М5
t(5;14)(q31;q32)	ГЛЛ	i(11q)	ГМЛ
t(5;16)(q33;q22)	ГМЛ	del(11)(p11-12)	ГМЛ
del(6)(q13;q27)	ГЛЛ	del(11)(p11-23)	ГЛЛ
t(6;9)(p23;q34)	ГМЛ М2, МДС	del(11)(q23)	ГМЛ
t(6;11)(q27;q23)	ГМЛ М5	t(11;11)(q23;q25)	ГМЛ М5
del(5)(q12;q35)	ГМЛ,	t(10;14)(q24;q11)	Т-ГЛЛ

	МДС		
i(7q)	ГМЛ, МДС	t(11;13)(p15;q11)	Т-ГЛЛ
del(7)(q11)	ГЛЛ	t(11;17)(q23;q21)	ГМЛ
del(7)(q14)	ГМЛ	t(11;14)(p13;q11)	Т-ГЛЛ
del(7)(q22)	ГМЛ, МДС	t(11;17)(q23;q25)	ГМЛ
del(7)(q32)	ГЛЛ	t(11;19)(q23;p13)	ГМЛ, ГЛЛ
t(7;9)(p11;q11)	ГЛЛ	t(11;20)(p15;q11)	ГМЛ
t(7;9)(q35;q32)	Т-ГЛЛ	t(X;11)(q24;q13)	ГМЛ
i(12p)	ГМЛ	del(16)(q22)	ГМЛ М4
del(12)(p11-13)	ГМЛ, ГЛЛ	inv(16)(p13;q22)	ГМЛ М4
t(12;14)(q24;q32)	ГМЛ	t(16;16)(p13;q22)	ГМЛ М4
t(12;17)(p12;q12)	ГЛЛ	t(16;21)(p11;q22)	ГМЛ
i(14q)	ГМЛ	del(17)(q22)	ГМЛ
inv(14)(q11-32)	Т-ГЛЛ, Т-ХЛЛ	del(20)(q11-13)	ГМЛ, МДС
del(14)(q11-24)	ГЛЛ	i(21q)	ГМЛ, МДС
t(14;22)(q32;q11)	ГЛЛ	del(22)(q11-13)	ГМЛ, ГЛЛ
t(15;17)(q22;q21)	ГМЛ М3	del(X)(q24)	ГМЛ
t(14;18)	common ГЛЛ	t(17;19)	ГЛЛ
t(12;21)	ГЛЛ	t(3;12)(q28;q13)	ГЛЛ

Примітки:

Таблиця складена за даними джерел [35, 47, 48, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 68, 70, 76, 81, 83, 88, 89, 93, 95, 100, 101, 103, 112, 113, 115, 120, 121, 126, 131, 132, 135, 137, 141, 145, 149, 153, 156, 157, 158, 139, 160, 170, 174, 179, 187, 194, 199, 206, 210, 211, 219, 221, 222, 223, 228, 231, 232, 237, 241, 243, 249, 255, 262, 264, 269, 271, 274, 275, 285, 287, 294].

Т-ГЛЛ – Т-клітинна форма ГЛЛ

МДС – мієлодиспластичний синдром.

М1, М2, М3, М4, L3 – типи лейкозів згідно FAB-класифікації.

del – делеція.

t – транслокація.
i – ізохромосома.
inv – інверсія.
ins – інсерція.

На сьогодні таких хромосомних мутацій описано більше 70 [56, 57, 58, 59, 243]. Список цих первинних хромосомних мутацій наведено в табл. 11.1. У цій таблиці наведені, звичайно, не всі хромосомні мутації, які на сьогодні вважаються невинуватими при гострих лейкозах. Не вказана, зокрема, низка унікальних мутацій, що виявлені дослідниками поодинокі – лише один раз і охоплювали не одну чи дві хромосоми одночасно, а більше. Так, Фогу Г. (Fogu G.) зі співавторами описали унікальну комплексну транслокацію, що охопила 3 хромосоми одночасно: t(5;15;17) і викликала гострий промієлоцитарний лейкоз (ГпроМЛ) [101]. Ковальчик Й. (Kowalczyk J.) і співавтори описали рідкісний випадок ГЛЛ з транслокацією t(Y;2) [156]. Тут вирішальну роль грали зміни в хромосомі 2, і ця мутація аналогічна за своєю суттю таким мутаціям як del2(p21) чи del2(p23) [56, 57, 58, 59]. У таблицю не включена низка мутацій, первинність яких лишається дискусійною. Так, різні автори по-різному оцінюють первинність моносомії при ГЛЛ: Руссо К. (Russo C.) та співавтори, Пайетта Е. (Paietta E.) та співавтори вважають моносомію при ГЛЛ первинною мутацією, тоді як Юніс Дж. (Yunis J.) схильний вважати подібні аномалії вторинними [210, 241, 243].

Деякі інші повідомлення лишаються вкрай дискусійними. Так, Тауб Дж. (Taub J.) та співавтори описують хворих на ГЛЛ, в яких єдиною виявленою хромосомною аномалією був мозаїцизм клітин по Y-хромосомі: 46, XY/47, XXУ [269]. Але, очевидно, що ця

аномалія не має безпосереднього відношення до онкогенезу ГЛЛ і є випадковою [55 – 59].

Важливість дослідження хромосомних аномалій при гострих лейкозах усвідомили на початку 1980-тих років. Саме на той час припадає пік досліджень цитогенетичних аспектів патогенезу лейкозів. Сандберг А. (Sandberg A.) висловив думку, що ефективне лікування, прогнозування та діагностика гострих лейкозів неможлива без врахування рівня дисбалансу геному трансформованих клітин [243]. Інтенсивно в 1980-тих та в 1990-тих роках проводилися пошуки нових невідповідних хромосомних мутацій, що викликають патогенез ГЛЛ та інших форм лейкозів. Пізніше популярність цитогенетичних методів знизилась, на перший план висунулись методи молекулярних досліджень, пов'язаних з полімеразною ланцюговою реакцією (PCR) та імунологічні методи [132].

Проте і сьогодні тривають пошуки специфічних аномалій каріотипу, хромосомних мутацій, притаманних для окремих типів лейкозів, хоча значні міжособові варіації в стані хромосомного апарату онкотрансформованих клітин мають місце і в межах окресленої нозологічної форми захворювань [131]. Розпізнають первинні та вторинні зміни каріотипу в лейкозних клонах. Порушення в одній і тій же хромосомі в різних клітинах переважно носять первинний характер для цього процесу і для гострих лейкозів в тому числі. Вторинні зміни не одиничні, іноді множинні, вони характеризують так звані вторинні гострі лейкози, що часто розвиваються після масивної цитостатичної терапії інших онкозахворювань. Ці вторинні мутації, згідно з роботами Сандберга А., часто захоплюють 5-ту і 7-му хромосоми [243]. Відсоток випадків гострих лейкозів, при яких наявні невідповідні хромосомні аномалії, в різний час називався різний. Єдиної точки зору на сьогодні на це

питання не існує. Ще донедавна називалось число 60 % при гострих мієлобластних лейкозах і 70 % при гострих лімфобластних лейкозах. Нині Бергер Р. вважає, що в 90 % ГЛЛ наявні невинні хромосомні аномалії [55 – 59], а Сандберг А., що невинні хромосомні аномалії наявні в усіх або майже в усіх випадках ГЛЛ (98 – 100 % випадків ГЛЛ) [243], але в окремих випадках ці мутації не виявляються – або ріст в культурі дають виключно нормальні клітини, або ці хромосомні сегментні мутації зачіпають настільки малу ділянку хромосоми, що ця мутація не фіксується візуально і можлива для ідентифікації тільки при PCR-діагностиці [243]. Але Чінь І. (Chin Y.) вважає, що причиною ГЛЛ можуть бути крім хромосомних і точкові мутації в кластерах протоонкогенів. Ці мутації принципово не можуть бути виявлені цитогенетично [78].

Далеко не всі невинні хромосомні мутації зустрічаються при ГЛЛ з однаковою частотою. Найчастіше зустрічаються такі чотири мутації: $t(4;11)$, $t(9;22)$, $t(1;19)$, $t(8;14)$. При цьому перші дві мутації корелюють з особливо несприятливим прогнозом. Деякий час дискутувалося питання про те, чи $t(9;22)$ – тобто філадельфійська хромосома (ph^+) викликає не тільки ХМЛ чи ГМЛ, а також і ГЛЛ. Але дискутується досі, чи в хворих з філадельфійською хромосомою справді має місце ГЛЛ як окреме захворювання, а не бластна криза хронічного лейкозу – ХМЛ лімфоїдного типу. Проте більшість дослідників схильні до думки, що саме окремою різновидністю ГЛЛ є ph^+ ГЛЛ.

Раніше вважалося, що наявність будь-якої хромосомної аномалії при ГЛЛ є вкрай несприятливим прогнозом, але згідно із сучасними уявленнями про обумовленість всіх випадків ГЛЛ хромосомними мутаціями, йде мова лише про прогностичне значення тих

чи інших хромосомних мутацій та про нестабільність геному як несприятливий прогностичний фактор. Слід зазначити, що хіміотерапія і весь комплексний підхід до лікування ГЛЛ постійно вдосконалюється, і тому «несприятливість» того чи іншого цитогенетичного маркера переглядається [243]. Чітко доведено, що існує прямий зв'язок між змінами фенотипу лейкозних клітин і хромосомними аномаліями, що рееструються в них.

Таблиця 11.2. Деякі химерні гени, що викликають різні форми гострих лейкозів.

Химерний ген	Мутація, що викликає його появу	Форми лейкозів, які викликають ці химерні гени
TEL-ALB	t(9;22)	ГЛЛ
TEL-AML1	t(12;21)	ГЛЛ
E2A-PBX1	t(1;19)	ГЛЛ, ГМЛ
BCR-ALB	t(9;22)	ГЛЛ, ГМЛ, ХМЛ
E2A-HLF	t(17;19)	ГЛЛ
IGH-BCL2	t(4;18)	ГЛЛ
MLL-AF4	t(4;11)	ГЛЛ
MLL-AF9	t(9;11)	ГЛЛ, ГМЛ 5a
MLL-RARA	t(11;17)	ГМЛ М3
MLL-ENL	t(11;19)	ГЛЛ, ГМЛ
ALL1-AF4	t(1;4)	ГЛЛ
TEL-PDGFRB	t(5;12)	ХМЛ
AML1-EAP	t(3;21)	ХМЛ, ГМЛ М1
AML1-ETO	t(8;21)	ГМЛ М2
PML-RARA	t(15;17)	ГМЛ М3
MLL-ALL1	T(4;11)	ГЛЛ, ГМЛ

Зокрема, доведено, що хромосомні перебудови обумовлюють розвиток особливого типу клітинного диференціювання, наприклад t(8;21) гальмує ріст моноцитів, посилює диференціювання гранулоцитів. Доведено, що клітини з хромосомними аномаліями є лейкозною популяцією, а клітини зі звичайним каріотипом не зачеплені лейкозним процесом. Також показано, що хромосомні аномалії можуть з'являтися на рівні частково комітованих клітин попередників, що веде до збереження каріотипів інших ліній гемопоєзу [14].

Як бачимо, теорія патогенезу ГЛЛ розвивається в контексті загальної теорії онкогенезу. Нині створюється загальна єдина універсальна теорія онкогенезу і лейкозогенезу – як вірусного так і невірусного. Загалом сучасну теорію онкогенезу можна коротко викласти наступним чином. Майже всі онкотрансформовані клони виникають внаслідок посиленої або неправильної експресії ключових регуляторних генів клітини. Злоякісна трансформація клітин може бути результатом однієї з наступних первинних генетичних подій:

1. Вбудовування в геном додаткових (або модифікованих) копій ключового регуляторного гена під контролем сильного промотора.
2. Вбудовування промотора, що посилює експресію вже наявного клітинного регуляторного гена.
3. Мутації в клітинному регуляторному гені, що змінюють його експресію.

12. Молекулярно-генетичні механізми онкогенезу

Хромосомні перебудови можуть зачіпати локуси, які включають протоонкогени, що призводить до перетворення протоонкогена в онкоген, або до виникнення химерних генів, і як наслідок, – до патологічної

проліферації і розвитку однієї з форм гострих лейкозів чи лімфом. Найбільш досліджені на сьогодні химерні гени наведені в табл. 11.2.

Зміни хромосом можуть проявлятися посередньо: гени і протоонкогени, що контролюють регуляцію проліферації, внаслідок хромосомної перебудови можуть бути поставлені в інші умови, що буде вести до порушення їх діяльності. Найбільш досліджені протоонкогени людини, мутації в яких або біля яких пов'язані з гострими лейкозами, наведені в табл. 12.1.

Таблиця 12.1. Протоонкогени людини, мутації в яких пов'язані з патогенезом гострих лейкозів та лімфом.

Протоонкоген	Локалізація (хромосома, локус)	Форма лейкозу
BRAF	7q34	ГЛЛ, НГЛ
FMS	5(q32)	ГМЛ, ХМЛ М4
MYB	6(q23.3)	ГЛЛ
MYS	6(q22-q24)	ГЛЛ
KPAS1	6(pter-q13)	ГМЛ
ERBB	7(pter-q22)	ГМЛ
MOS	8(q22)	ГМЛ
c-ALB	9(q34-qter)	ГЛЛ, ГМЛ, ХМЛ
LCK	1(p34)	Т-ГЛЛ
FES	15(q24-q26)	ГпроМЛ
ERB A1	17(p11-qter)	ГпроМЛ
SIS	22(q11-q13)	ГЛЛ, ГМЛ, ХМЛ
BCL-3	19(q13)	ХЛЛ
BCL-2	18(q21)	В-лімфосаркома
MLL	11(q23)	ГЛЛ, ГМЛ
AML1	21(q22)	ГМЛ, ХМЛ

PML	15(q22)	ГМЛ
TAL1(SCL)	1(p34)	Т-ГЛЛ
TAL1	14(q19)	ГЛЛ
TAL2	9(q32)	Т-ГЛЛ
TAN1	9(p34)	Т-ГЛЛ
LYT10	10(q24)	НГЛ
PBX1	1(q23)	пре-В-ГЛЛ
CAN	9(q34)	ГМЛ
E2A	19(p13.3)	пре-В-ГЛЛ
НОХС11	12(q13.13)	Т-ГЛЛ
LYL1	19(p13.13)	Т-ГЛЛ
RARA	17(q12)	ГпроМЛ
RBTN 1 (TTG 1)	11(q15)	Т-ГЛЛ
RBTN 2	11(p13)	Т-ГЛЛ
BCR	22(q11)	ГЛЛ, ХМЛ
RCK	11(q23)	ГЛЛ, ГМЛ

Всі протоонкогени в нормі виконують певну функцію (фактори росту та ін.) і лише після мутації перетворюються в онкогени. Внаслідок мутації протоонкоген або переноситься, або ставиться в такі умови (внаслідок мутації в регуляторній ділянці), що спонукають його до активації, чи вимикають механізм контролю. Не виключено, що для повної злоякісної трансформації клітини повинна пройти багатоетапна послідовність подій: стимуляція проліферації з виникненням популяції постійно проліферуючих клітин, трансформація і власне малігнізація.

Одним із найбільш досліджених протоонкогенів людини є ген **ALB**. Це доволі великий (200 kb) гомолог гена v-alb мишачого лейкозу Абелонса. Внаслідок мутації t(9;22) відбувається вбудовування цього гена в кластерну область середньої частини іншого великого гена (130 kb) в

сайт BCR (5,8 kb). Химерний ген BCR/ALB – матриця великої (210 kD) тирозинкінази, що гомологічна до інших цитоплазматичних тирозинкіназ (SRC, SH1). Цей химерний білок, активуючи RAS-сигнальний шлях, викликає онкотрасформацію клітин.

Іншим дослідженим протоонкогеном є ген **TEL** – ген транскрипційного активатора, що входить до ETS сімейства генів. Він здійснює контроль реплікації ДНК, визначає взаємодію «протеїн – протеїн». Внаслідок мутації t(5;12) утворюється химерний ген TEL/PDGFRB. Другий компонент химерного гена в нормі – ген β -рецептора росту продукування тромбоцитів, що локалізований на хромосомі 5. Ген TEL вбудовується в ген PDGFRB і стимулює його тирозинкіназну активність, вмикає RAS-сигнальний шлях, чим і викликає онкотрансформацію клітин.

Доволі ретельно досліджений протоонкоген **BCL**, точніше ціле сімейство генів, гомологічне гену *ced* нематод – деякі гени з цього сімейства (*ced-3*, *ced-4*) стимулюють апоптоз клітин [16].

Інші гени цього сімейства (*ced-9*) пригнічують апоптоз. Химерний продукт BCL3 надає лімфоїдним клітинам ознаки «безсмертя».

Ген BCL2 картований у людини в 18 хромосомі в області q21. Він гомологічний гену *ced-9*. Його білковий продукт (25 kD) відноситься до мембранних білків. Вбудовування цього гену в проксимальні області локалізації локусу важких ланцюгів імуноглобулінів призводить до неадекватного рівня експресії цього протеїну, інгібує апоптоз, надає проліферативні переваги мутантним клітинам, підвищує чутливість до мутагенних сигналів.

Протоонкоген **MLL** (його ще називають ALL-1, Htrx, HRX) – в нормі експресується в селезінці, в печінці, в

серці, в легенях, у Т-лімфоцитах, В-лімфоцитах та їх попередниках. Цей ген кодує протеїн розміром 430 kD, діє як транскрипційний фактор.

Протоонкоген **AML1** належить до цілого сімейства транскрипційних регуляторних білків, гомологічних ядерному ДНК-зв'язуючому runt-протеїну дрозофіли, експресується в гемопоетичних клітинах та ідентифікується як α -субодиниця зв'язуючого фактора (CBF). У людини цей ген кодує поліпептид, який складається з 250 амінокислот, що може інгібувати диференціювання клітин гранулоцитного ряду.

Протоонкоген **PML** у нормі експресується різними тканинами ембріону або дорослого організму, очевидно, має функцію міжбілкової взаємодії, димеризації протеїнів і посттрансляційно фосфорилується протеїнкіназою II. При транслокаціях типу t(15;17) зачіпаються кластерні області генів BCR1, BCR3, BCR2. Саме ці ділянки гена зливаються з інтроном 2 гена RARA рецептора вітаміну А, тобто транскрипційного фактора суперсімейства стероїдних рецепторів на хромосомі 17, що беруть участь у морфогенезі клітин. При цьому утворюються химерні гени PML/RARA або RARA/PML.

У той же час немає прямих достатніх доказів того, що ті аномалії, які не супроводжуються виникненням химерних генів (які є онкогенами) є прямою причиною розвитку ГЛЛ, чи вони є лише свідченням нестабільності геному [9, 16, 14, 30].

Слід додатково сказати і про вірусну теорію онкогенезу лейкозів, яка в свій час була популярною, особливо після відкриття і дослідження вірусу Епштейна-Барр, після дослідження патогенезу африканських лімфом позитивних до вірусу Епштейна-Барр. Проте, потім у цих же лімфомах було виявлено маркерну хромосомну мутацію t(8;14) – це було описано в роботах Еріксона Дж.

(Erikson J.) і співавторів [95]. Нині положення вірусної теорії переглянуті, особливо після того, як було доведено чисельними роботами, що онкогени вірусного походження часто є ідентичними онкогенам клітинного походження, що виникли внаслідок мутації протоонкогена. Віруси можна розглядати як мутагенний фактор та фактор, що може посилювати нестабільність геному. Зрештою, не так суттєво, чи онкоген заноситься вірусом, чи виникає в результаті мутації – подальша доля трансформованих клітин залежить від цілої низки наступних процесів.

Характеристика деяких протоонкогенів, мутації в яких можуть викликати лейкози та лімфоми

B-RAF (або **c-RAF**) – ген цитозольної серин/треонінової протеїнкінази сімейства MAP3K. Розташований в довгому плечі 7 хромосоми в області 7q34. Кіназа B-Raf бере участь у формуванні внутрішньоклітинних сигналів, що направлені на клітинний ріст, диференціювання, секрецію. У 2002 році було доведено, що мутація цього гена може викликати канцерогенез людини. Були розроблені терапевтичні агенти, які застосовують при лікуванні онкологічних захворювань, що обумовлені мутаціями цього гена, зокрема, це препарати вемурафеніб та дабрафеніб. У людини виявлено більше 30 мутацій цього гена, що викликають канцерогенез. Частота мутацій цього гена при різних онкологічних захворюваннях відмінна. При меланомі вона складає більше 80 %, при легеневій карциномі до 3 %. Мутації цього гена викликають негоджкінські лімфоми (НГЛ) та низку інших онкологічних захворювань. 90 % мутацій протоонкогена B-RAF з його наступним перетворенням в онкоген – це мутація заміни тиміна на аденін у 1799 нуклеотиді цього

гена. Наслідком цього є заміна валіну на глутамінову кислоту в 600 кодоні. Інші виявлені мутації: R461I, I462S, G463E, G463V, G465A, G465E, G465V, G468A, G468E, N580S, E585K, D593V, F594L, G595R, L596V, T598I, V599D, V599E, V599K, V599R, V600K, A727V та ін. Більшість цих мутацій зосереджені в кластерах гліцин збагаченої Р-петлі в активному сегменті. Ці мутації пов'язані з перетворенням активуючого сегмента з неактивного стану в активний, що призводить до активації цього фермента в цілому. Інші мутації навпаки – знижують активність B-Raf, але це в свою чергу активує кіназу C-RAF [260].

FMS (або **c-FMS**) – ген колонієстимулюючого фактора 1, відомого також як макрофаг колонієстимулюючий фактор рецепторів. Ген розташований на довгому плечі хромосоми 5 в області 32. Довжина гена 60 kb, білок має масу 107 kD. Перший інтрон цього гена має транскрипційно неактивний рибосомний білок L7, що по суті є псевдогеном (ψ -геном), який ще й розташований в протилежному напрямку до всього гена. Білок цього гена є мембранним білком, який виконує функцію рецептора колонієстимулюючого фактора 1, що управляє диференціюванням і функцією макрофагів. Мутації цього гена можуть викликати ХМЛ М4 – хронічний мієломоноцитарний лейкоз.

MYB – ген з великого сімейства генів факторів транскрипції. Білок містить три домени AN N-кінцевий домен, центральний домен активації транскрипції та C-кінцевий домен, що бере участь в транскрипційній репресії.

MYC (або **c-MYC**) – ген фактора транскрипції. Регулює експресію 15 % всіх генів людини, зв'язується з онханцерними послідовностями, посилює активність ацетилювання гістонів, регулює структуру хроматину, змінюючи ацетилювання гістонів у ділянках, що багаті активними генами. Мутації цього гена вивлені при багатьох онкологічних захворюваннях – при цьому цей ген експресується постійно, викликаючи порушення регуляції багатьох генів, у тому числі генів, що відповідають за проліферацію клітин. Транслокація t(8;14) зачіпає 8 хромосому, де розташований ген MYC і викликає лімфому Беркітта. Інгібування цього гену призводить до загибелі ракових клітин, що робить цей ген перспективним як мішень хіміотерапії. Клітинний ген MYC був відкритий в 1982 році як гомолог вірусного гена v-MYC, що викликає мієлоцитопатоз птахів. Транскрипція гена MYC людини починається з 4 різних промоторів: P0, P1, P2, P3. мРНК та білок гена MYC мають дуже короткий час півжиття – 15 та 30 хвилин відповідно [98].

ERBB – сімейство генів людини, які кодують рецептори тирозинкінази, що структурно зв'язані з рецептором епідермального фактора росту. Відомі гени ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, гомологічні відомому вірусному гену. Мутації клітинних генів ERBB та їх вірусні гомологи викликають у людини еритробластний гострий мієлобластний лейкоз – ГМЛ М6. Мутації цього гена, що призводять до зниження його функції викликають нейродегенеративні захворювання, хворобу Альцгеймера, розсіяний склероз. Мутації, що викликають надмірну функцію цього гена є причиною низки різних онкологічних захворювань [75].

MOS – ген, що кодує серин/треонін кіназу, розташований у 8 хромосомі людини. Білок має масу 346 амінокислот і масу 37 820 D [124].

LCK – ген з родини src-тирозинкіназ. Білок, що кодує цей ген, фосфорилує тирозинові залишки клітинних білків-мішеней в Т-лімфоцитах. Локалізований на короткому плечі 1 хромосоми. Кодує білок розміром 509 амінокислот, маса білка – 56 kD. Білок задіяний у таких біологічно важливих процесах, як взаємодія вірус-господар, має сайт зв'язування з АТФ, локалізований у клітинній мембрані та цитоплазмі [290].

FES – ген розташований на довгому плечі 15 хромосоми людини. Кодує білок, що має довжину 822 амінокислотних залишки. Маса білка – 93 497 D. Кодований білок належить до трансфераз, кіназ, тирозинових протеїнкіназ, фосфопротеїнів. Задіяний в альтернативний сплайсінг. Має сайт зв'язування з АТФ, нуклеотидами, ліпідами. Локалізований в клітинній мембрані, цитоплазмі, цитоскелеті, в клітинних контактах, цитоплазматичних везикулах, в апараті Гольджі. Мутантний клітинний ген аналогічний до вірусного гена, що викликає саркому котів. Ген бере участь у нормальному кровотворенні, мутації цього гену викликають гострий промієлобластний лейкоз [263].

SIS (або PDGF-B) – ген, що розташований в 22 хромосомі людини. Аналогічні гени виявлені в мишей, котів та інших ссавців. Кодує фактор росту, що підвищує кількість мегакаріоцитів та інтенсивність продукування ними тромбоцитів. Структурно містить 7 екзонів, розміри гена 20 kb. Білок довжиною 241 амінокислотних залишків, маса 27 283 D. Білок є

мітогеном для клітин мезенхімного походження. Мутації цього гена крім лейкозів викликають менінгіому, дерматофібросаркому [159].

BCL-2 – ген, що кодує білок, який є регулятором апоптозу. Подавляє апоптоз в різних клітинах, в тому числі в лімфоцитах та їх попередниках. Регулює апоптоз, контролюючи проникність мітохондріальної мембрани. Інгібує каспази за рахунок виходу цитохрому с з мітохондрій або за рахунок зв'язування фактора, що активує апоптоз – фактору АРАF1. Мутації цього гена викликають різні форми лейкозів та лімфом [82].

BCL-3 – ген, який кодує білок, що належить до активаторів та фосфопротейнів. Ген розташований в довгому плечі 19 хромосоми. Білок довжиною 454 амінокислоти, маса 47 584 D. Задіяний в процесі транскрипції, локалізований в цитоплазмі та ядрі. Мутації цього гена викликають В-клітинні лімфобластні лейкози та лімфоми [53].

MLL (або KMT 2A) – ген, що кодує білок гістон-лізин-метилтрансферазу 2A. Це один із глобальних регуляторів транскрипції генів. Належить до гістон-модифікуючих ферментів. Бере участь в епігенетичній підтримці транскрипційної пам'яті. Мутації цього гена викликають агресивні форми лейкозів та інші патології – синдром Відемана-Штейнера, шизофренію [176].

AML1 (або RUNX 1) – ген, що розташований в 21 хромосомі в області 22q22.12. Білок, що кодує цей ген, є фактором транскрипції, що задіяний в процес диференціювання клітин крові. Крім того, цей ген задіяний в процес диференціації нейронів. Мутації

цього гена викликають лейкоз ГМЛ M2 та рак молочної залози. У людини цей ген має розміри 260 kb. Ген може бути транскрибований з двох альтернативних промоторів – 1 (дистально) та 2 (проксимально). У результаті можуть бути синтезовані дві ізоформи фермента. Повнорозмірний білок цього гена кодується 12 екзонами. Білок містить важливі функціональні домени: домен RHD (екзони 3, 3, 4) та домен TAD (екзон 6). Ці домени необхідні для зв'язування з ДНК та для взаємодії білок-білок відповідно. Білок складається з 453 амінокислот [218].

PML – ген, що кодує білок, який виконує функції супресора онкотрансформації, бере участь в утворенні структур ядра клітини, які називають PML-тілами і утворюються серед хроматину в кількості 1 – 30 структур на клітинне ядро. Білок бере участь в процесах, що забезпечують стабільність геному, апоптоз, противірусні ефекти, контроль проліферації клітин. Мутації цього гена викликають порушення цих процесів і як результат – канцерогенез різних форм раку, в тому числі гострих лейкозів. Ген розташований в довгому плечі 15 хромосоми людини. Ген розміром 53 kb, складається з 10 екзонів, існують форми альтернативного сплайсінгу цього гена, що утворюють 15 відомих ізоформ цього фермента [293].

TAL1 (SCL) – ген, що розташований в короткому плечі 1 хромосоми. Кодує білок довжиною 331 амінокислоту, масою 34 271 D. Цей білок виконує функцію регуляції транскрипції і належить до так званих білків розвитку – активний під час ембріогенезу. Локалізований в ядрі клітини, має сайти зв'язування з ДНК. Мутації цього гена викликають розвиток ГЛЛ [44].

LYT10 (NFKB2) – ген розташований на довгому плечі 10 хромосоми. Кодує білок довжиною 900 амінокислот, масою 96 749 D. Білок виконує функцію репресора, активатора. Належить до фосфопротеїнів. Задіяний у функції регуляції транскрипції, сплайсингу, біологічних ритмів. Має сайт зв'язування з ДНК. Локалізований в ядрі та цитоплазмі. Є частиною – одною з субодиниць фактору транскрипції NF- κ B, що в клітині стимулюється чисельними зовнішніми та внутрішніми факторами (цитокіни, кисень, віруси, бактерії). У результаті посттрансляційної модифікації перетворюється в білок p52 [110].

PBX1 – ген розташований на довгому плечі хромосоми 1. Кодує білок довжиною 430 амінокислот, масою 46 636 D. Білок належить до репресорів, активаторів, білків розвитку. Активний під час ембріогенезу. Задіяний в регуляції транскрипції, має сайт зв'язування з ДНК. Локалізований в ядрі. Мутація гена викликає розвиток пре-B-ГЛЛ [245].

E2A (TCF3) – ген розташований на короткому плечі 19 хромосоми, кодує білок розміром 654 амінокислотних залишків, масою 67 600 D. Білок належить до фосфопротеїнів. Задіяний в регуляції транскрипції, диференціації клітин, нейрогенезу, альтернативного сплайсингу. Має сайт зв'язування з ДНК. Локалізований в ядрі. Білок відіграє вирішальну роль в лімфопоезі B та T лімфоцитів. Мутації цього гена викликають гострі лейкози та лімфоми [163].

NOXC11 – ген, що розташований в довгому плечі 12 хромосоми. Кодує білок, що має довжину 304

амінокислотних залишки, масу 34 748 D. Належить до білків розвитку – активний під час ембріогенезу, морфогенезу, зокрема, бере участь в морфогенезі кишківника. Задіяний в регуляції транскрипції, має сайт зв'язування з ДНК, локалізований в ядрі [193].

LYL1 – ген розташований в короткому плечі 19 хромосоми. Білок, що кодує цей ген, має довжину 280 амінокислот, маса 29 938 D. Належить до фосфопротейнів. Задіяний в процес регуляції транскрипції. Має сайт взаємодії з ДНК. Локалізований в ядрі [186].

RARA – ген розташований в довгому плечі 17 хромосоми. Білок, що він кодує, має довжину 462 амінокислотних залишки, масу 50 771 D. Білок належить до рецепторів, фосфопротейнів. Є рецептором ретиноевої кислоти. Утворює гетеродимер RXR/RAR. При відсутності ліганду цей гетеродимер пригнічує транскрипцію шляхом набору компресорів NCOR1, SMRT (NCOR2) та гістондеацетилази. Задіяний у процесі транскрипції та альтернативного сплайсінгу. Білок має сайти зв'язування з йонами металів (зокрема, цинку), ДНК. Локалізований в цитоплазмі та ядрі. Мутації цього протоонкогену викликають розвиток гострих лейкозів [128].

BCR – ген, що розташований на довгому плечі 22 хромосоми. Білок, який він кодує, має довжину 1 271 амінокислотних залишків, масу 142 819 D. Білок належить до трансфераз, кіназ, серин/треонін-протеїнкіназ, активаторів ГТФ-аз, фосфопротейнів. Задіяний в процесі ацетилювання та в альтернативний сплайсінг. Білок має сайти зв'язування з нуклеотидами

та АТФ. Локалізований в мембрані, синапсах, клітинних контактах. Виявлено дві ізоформи цього білка, що утворюються при різних варіантах транскрипції. При утворенні філадельфійської хромосоми утворюється мутантна форма цього гена (хімерний ген – з геном ALB) [293].

13. Хромосомні аномалії і проблема класифікації гострих лейкозів

У розділі 2 наведена FAB класифікація гострих лімфобластних лейкозів. Ця класифікація досить поверхова – базується на морфологічних характеристиках бластних клітин, що можуть змінюватись протягом часу перебігу захворювання, можуть по різному інтерпретуватися різними дослідниками. Існує необхідність нової класифікації ГЛЛ з врахуванням хромосомних аномалій, онкогенів та імунологічних характеристик. Хоча це стало очевидно досить давно, але досі нова класифікація ГЛЛ перебуває на стадії обговорення та розробки.

З точки зору цитології та морфології клітин гострий лімфобластний лейкоз є гемобластозом, що характеризується неконтрольованою проліферацією злоякісних лімфоїдних клітин – їх попередників та незрілих лімфоцитів на різних стадіях дозрівання. За клініко-морфологічними характеристиками ГЛЛ суттєво і значно відрізняється від гострих мієлобластних лейкозів. ГЛЛ частіше трапляється серед дітей – ГЛЛ переважає всі інші форми лейкозів (і всі інші форми онкологічних захворювань) саме в дитячому і підлітковому віці. ГЛЛ значно рідше трапляється в дорослих і складає в них менше 25 % лейкозів [14, 16].

З імунологічної точки зору ГЛЛ можна поділити на такі найбільші групи:

- 1) Гострий Т-лімфобластний лейкоз.
- 2) Гострий В-лімфобластний лейкоз.
- 3) Гострий common-лімфобластний лейкоз (загальний).
- 4) Гострий 0-лімфобластний лейкоз (ні Т- ні В-ГЛЛ) [14].

У свою чергу кожна з цих груп ділиться на дрібніші категорії. Наприклад, серед В-ГЛЛ розрізняють пре-В-ГЛЛ, пре-пре-В-ГЛЛ і т.д. Завдяки імунологічним маркерам та методам проточної цитофлуориметрії можна розрізнити надзвичайно багато форм ГЛЛ, що відрізняються різним рівнем дозрівання злоякісних лімфобластів.

Т-лімфобластний гострий лейкоз (Т-ГЛЛ) складає до 25 % всіх випадків ГЛЛ, чоловіки хворіють частіше за жінок (4:1), дорослі частіше ніж діти. Для цієї форми ГЛЛ характерний більш агресивний і більш злоякісний перебіг захворювання, більш виразні ознаки гіперпластичного синдрому: більш високий рівень лейкоцитів, пухлинні розростання лімфатичних вузлів, збільшення печінки та селезінки, висока частота виникнення нейролейкозів [9, 14, 16]. Морфологічно лейкозні клітини частіше типу L2, часто виявляються клітини так званого «ручного дзеркальця», імунологічно характеризуються як незрілі. У цих клітинах виявляється висока активність ферменту деоксинуклеотидилтрансферази (ТДТ), ядерного маркеру Т-лімфоцитів, виражена активність кислої фосфатази у вигляді плям в цитоплазмі [14]. Т-лімфоцитам на різних стадіях клітинної диференціації навіть в процесі дозрівання властивий антиген р40. Т-лімфоцити беруть участь у реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, за це відповідальний антиген Т-11(Leu-5). На бластних клітинах більшості хворих на Т-ГЛЛ присутній антиген р67, у 55 % випадків виявляється антиген кортикальних

лімфоцитів Т6, антигени Т3, Т4, Т8 трапляються з різною частотою і в різних комбінаціях, але всі вони властиві Т-клітинній популяції. 25 % хворих на Т-ГЛЛ мають бластні клітини, що експресують загальний ГЛЛ (з-ГЛЛа). Під час молекулярного аналізу геному бластних клітин було виявлено, що Т-клітини лейкозного клону характеризуються реанжируванням генів β -лацюгів Т-клітинних рецепторів і відсутністю перебудов генів імуноглобулінів [14].

Загальний лімфобластний лейкоз (З-ГЛЛ або common-ГЛЛ) являє собою найпоширенішу форму ГЛЛ – 79 % всіх випадків ГЛЛ у дітей і 60 % ГЛЛ у дорослих. Найчастіше ця форма ГЛЛ зустрічається в дітей віком 3 – 5 років. Common-ГЛЛ значно менш агресивний, аніж Т-ГЛЛ, і в дорослих, і в дітей. Високий лейкоцитоз – більший ніж 50 млрд./л спостерігається в 3 рази рідше, пухлини середньостіння в 11 разів рідше, нейробластоз в 12 разів рідше, аніж при Т-ГЛЛ. Цитологія бластних клітин різного типу, активність ТДТ доволі низька. Клітини мають загальний антиген (З-ГЛЛа), HLA-Dr, але не мають інших антигенів, властивих Т- або В-клітинним лініям. При цьому варіанті ГЛЛ доволі часто трапляється мутація t(9;22) ph⁺, яка асоціюється з негативним прогнозом, але трапляється в 10 % випадків common-ГЛЛ [14].

Нуль-лімфобластний лейкоз (0-ГЛЛ) складає біля 10% всіх випадків ГЛЛ за виключенням дітей до 1 року, у яких цей показник значно вищий. За клінічними показниками цей варіант гетерогенний – разом з відносно позитивним перебігом і прогнозом описані випадки агресивного розвитку з первинною резистентністю до цитостатичної хіміотерапії. Бластні клітини цієї форми ГЛЛ не мають ні Т-клітинних, ні В-клітинних характеристик, не експресують загального антигена. Виявляється лише загальний для лімфоїдної популяції

маркер – пан-Т, а також HLA-Dr, підвищена активність ТДТ [14].

В-лімфобласний (В-клітинний) лейкоз (В-ГЛЛ) є відносно рідкісною формою всіх випадків ГЛЛ і складає загалом не більше 5 % всіх випадків ГЛЛ. Ця форма ГЛЛ характеризується найбільшою злоякісністю перебігу захворювання і гіршою відповіддю на терапію. Чоловіки хворіють частіше ніж жінки (5:1), діти – частіше аніж дорослі. Захворювання перебігає з тотальною інфільтрацією червоного кісткового мозку активно проліферуючими бластами типу L3, гепатоспленомегалією, аденопатією та іншими екстрамодулярними розростаннями (в нирках, слинних залозах та ін.). У загальному аналізі крові – анемія, тромбоцитопенія, часто – гіперлейкоцитоз. Ремісії індукуються набагато рідше, аніж під час перебігу інших варіантів ГЛЛ, тривалість ремісії переважно невелика. Імунологічні характеристики В-ГЛЛ виражені яскраво: лейкозні клітини несуть поверхневі імуноглобуліни, частіше IgM, мають Ja-подібний антиген, HLA-Dr, але позбавлені загального для ГЛЛ антигена, що може вказувати на більш високий рівень диференціації бластних клітин, аніж під час загального ГЛЛ. Для В-ГЛЛ типові хромосомні мутації:

- 1) Транслокації з участю генів імуноглобулінів (С1-4-ген важких ланцюгів імуноглобулінів, С2-ген легких ланцюгів χ -імуноглобулінів, С22-ген легких ланцюгів λ .
- 2) Мутації t(8;14), t(2;8).
- 3) Мутації t(8;22).
- 4) Мутації з участю хромосоми 1.

Такі загалом і нині лишаються підходи до класифікації гострих лімфобласних лейкозів. Система далека від досконалості і розуміння тонких механізмів онкогенезу щодо конкретного пацієнта. Лишається

сподіватися, що в майбутньому будуть розроблені більш досконалі класифікації, які в першу чергу будуть враховувати механізми онкогенезу, дію онкогенів, невивпадкові хромосомні мутації, що безпосередньо пов'язані з онкогенезом тої чи іншої форми ГЛЛ.

14. Проблема критеріїв ремісії гострих лейкозів

Питання ремісії гострих лейкозів та критеріїв ремісії є на сьогодні дуже актуальними. Низка критеріїв ремісії вважаються такими, що не несуть повної інформації про рівень ремісії, і гостро стоїть питання пошуку нових критеріїв ремісії. На сьогодні ремісію ГЛЛ розглядають як максимальне знищення бластних клітин і відновлення стовбуровими клітинами, що залишилися, нормального гемопоєзу. Але якщо бластна трансформація відбулась у ранньому генетично нестабільному, але нормально функціонуючому клоні, то цілком імовірно, що в ремісії цей клон залишиться живим. Близькість лейкозного клону до нормальних гемопоетичних і стовбурових клітин утруднює здійснення його вибіркоче знищення. Тому, в цьому випадку під час ремісії залишається можливість повторного розмноження бластноклітинного клону (рецидиву). Якщо ж відбувається повна загибель лейкозного клону, але нестабільність геному стовбурових клітин зберігається (чи зберігається нестабільність ділянок хромосом поблизу локалізації протоонкогенів), то існує висока імовірність рецидиву захворювання. Але в цьому випадку слід говорити не про рецидив, а про одужання і генезис нового аналогічного захворювання. Ранні рецидиви настають при проліферації лейкозного клону, що розвивається з кількох клітин, чи навіть з однієї лейкозної клітини, що вижила після хіміотерапії. Цей «новий» лейкозний клон повторює особливості

попереднього. Під час пізніх рецидивів лейкозний клон за своїми характеристиками, у тому числі і генетичними, відрізняється від початкового. Іноді тільки важко виявити відмінності між клонами різних рецидивів. Саме в цих випадках має місце нова мутація, нове утворення бластного клону з клітин червоного кісткового мозку, що мають нестабільний геном.

Попри значні успіхи дослідження проблем онкогенезу ГЛЛ, деякі дослідники висловлюють певний песимізм, зазначаючи, що навіть повне розшифрування молекулярно-генетичних механізмів лейкозогенезу навряд чи вирішить всі проблеми лікування гострих лейкозів. Це аргументується тим, що доля кожного конкретного хворого, клінічна реалізація перебігу захворювання поруч з самою онкотрансформацією значення мають і всі наступні взаємодії трансформованих клітин з макроорганізмом, що визначають тип прогресу лейкозу.

Всі дослідники нині усвідомлюють, що необхідно здійснити комплексне дослідження гострих лейкозів, пошук нових критеріїв ремісії, пошук нових факторів, що характеризують патологію і впливають на її перебіг. Одним із таких факторів є феномен передчасного розділення центромер (ПРЦ).

15. Центромера в нормальній клітині

Центромера – структура типова майже для всіх еукаріот, за винятком динофлагеллят (*Dinoflagellata*) та криптонад (*Cryptophyta*), геном і хромосоми яких влаштовані настільки своєрідно і відмінно від інших еукаріот, що дозволяє припустити про їх належність до окремишньої, дуже архаїчної лінії еволюції ядерних організмів. Крім цього, центромери відсутні в так званих голоцентричних хромосомах, що мають дифузний

кінетохор і трапляються в деяких організмів – в першу чергу протистів, але трапляються в деяких рослин і тварин.



Генріх Вільгельм Готфрід Вальдесер (1836 – 1921)

Під центромерою розуміють певну спеціалізовану ділянку ДНК хромосоми, яка з'єднує дві сестринські хроматиди. Під час мітозу нитки веретена поділу прикріплюються до центромери за допомогою кінетохору – мультипротеїнової структури, що відповідає за процес сегрегації хромосом. Розрізняють два типи центромер – точкові центромери та регіональні центромери. Точкові центромери являють собою короткі послідовності ДНК, що розпізнаються специфічними білками. Найкраще вивчені

точкові центромери в дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Для більшості еукаріот характерні так звані регіональні центромери, що охоплюють цілі області хромосом. Центромери являють собою найбільш звужену ділянку хромосом, в яких тісно контактують між собою сестринські хроматиди, пов'язані між собою по всій довжині центромер комплексом когезинів, що утворюється під час профазы.

Історія відкриття та дослідження центромер пов'язане з відкриттям і дослідженням хромосом. Хто саме першим відкрив і описав хромосоми і центромери відповідно – питання суперечливе. Приоритет у відкриттю хромосом і центромер віддають таким дослідникам як Едуард Адольф Стасбургер (1844 – 1912), Йоган Адам Отто Бючлі (1848 – 1920), Іван Дорофєєвич Чистяков (1843 – 1877) та іншим. Але так чи інакше сам термін хромосома запропонував Генріх Вільгельм Готфрід Вальдеєр (1836 – 1921) в 1888 році.

Центромера відноситься до тих структур та генетичних елементів клітини, які досі лишаються недостатньо дослідженими, не дивлячись на чисельні роботи і зусилля багатьох десятиліть: чимало аспектів будови і поведінки центромери лишаються досі нез'ясованими. Багато років панувала думка (висловлена Альбертсом Б. та співавторами [6]), що центромера являє собою пізньореplikуючу ділянку ДНК хромосоми і під час метафазы мітозу ця ділянка ще не є реплікованою. Після певного сигналу ця ділянка реплікується, і відбувається розходження центромер. Хоча автори зазначають, що в цій події мітозу багато аспектів є неясними і дискусійними. Також автори не схильні були вважати, що кінетохор чи його утворення якимось чином впливають на сам процес розділення центромер. На їх думку кінетохор бере участь виключно в подальшій динаміці хроматид, їх русі до

полюсів. Автори зазначали, що яким би не був істинний механізм явища розходження центромер, центромерна ДНК повинна мати особливі властивості, а саме: бути здатною організовувати кінетохор і лишатися з'єднаною зі своїм гомологом в сестринській хроматиді до початку анафази.

ДНК центромер дріжджів було виділено і клоновано. Виявилось, що в дріжджів властивості центромери обумовлені послідовністю ДНК довжиною менше 1 kb. Центромера дріжджів була клонована в плазміді дріжджів, що функціонує в нуклеоплазмі. Завдяки наявності центромери ці дріжджеві плазмиди отримали стабільність і почали реплікуватися одночасно з іншими хромосомами, не втрачалися в процесі мітозу.

Анафаза починається раптовим розщепленням кожної хромосоми, яке обумовлене розділенням сестринських хроматид в точці їх з'єднання в центромері. Це розділення на думку Альбертса Б. зі співавторами не залежить від інших подій мітозу і відбувається навіть в хромосомах, що не прикріплені до мітотичного веретена. Це розділення центромер дозволяє полярним силам веретена, які діють на метафазну пластинку, почати повільний рух хроматиди до полюса. Довгий час було невідомо, що втримує хроматиди разом до початку анафази, але була висунута гіпотеза, яка стверджує, що послідовність ДНК, яка утворює центромеру, кодує спеціальний сигнал, що блокує її власну реплікацію в фазі S. Нереплікована ДНК центромери не дозволяє хроматидам розходитись, а запуск її реплікації призводить до розділення хроматид в анафазі [6].

Слід зазначити, що багато авторів, які досліджували процес розділення центромер, виходили з протилежної концепції, вважаючи, що кінетохор або принаймні центромерні білки, що пов'язані також з формуванням

кінетохору, беруть участь у розділенні центромер. Цим авторам належить низка робіт з дослідження процесу утворення і функціонування кінетохору, найбільш детально ці питання описані в роботах Берната Р. (Bernat R. et al.), Керреброка А. (Kerrebrock A. et al.), Брінклі Б. (Brinkley B. et al.) та Годєя К. (Goday C. et al.). Так, Бернат Р. зі співавторами зазначають, що зв'язок між кінетохором і центромерою досі є практично не дослідженим [55]. Автори розглядають кінетохор як специфічну чотирихшарову структуру, що виконує функцію прикріплення мікротрубочок до специфічного сайту центромерного гетерохроматину. Автори досліджували процес формування кінетохору шляхом мікроін'єкції в клітину антицентромерних антитіл (ACAs), що розрізняють чотири центромерних протеїни в клітинах людини: CENP-A (17 kD), CENP-B (80 kD), CENP-C (140 kD), CENP-D (50 kD). CENP-A описують як центромерно специфічний гістон, варіант гістону H3. CENP-B описують як ДНК-зв'язуючий протеїн, що взаємодіє зі специфічними, довжиною 17 kb, послідовностями α -сателітної ДНК. Про CENP-C відомо значно менше, імовірно, він більше пов'язаний з кінетохорною активністю. CENP-D, судячи по всьому, пов'язаний з регуляцією конденсації хромосом. Автори схиляються до думки, що кінетохор є істотним компонентом сигналізації метафаз-анафазного переходу. До цієї думки їх наштовхнув факт зупинки мітозу на стадії метафази після ін'єкції ACAs під час інтерфази [60].

Центромерні протеїни продовжують широко досліджуватись. Про їх роль в мітозі продовжують висуватись різні гіпотези. Так, Мітчел А. (Mitchell A.) і співавтори схильні вважати, що центромерні протеїни (особливо CENP-B та CENP-E) якимось чином пов'язані з процесом метилювання ДНК в прицентромерних районах

хромосом, але яку саме роль грають ці протеїни в процесі метилування лишається невідомим [192].

Гени, що кодують білки CENP-B та CENP-C, були клоновані і секвіновані Буркіном Д. (Burkin D.) зі співавторами, проте, це не дало інформації про їх роль в процесі сегрегації центромер [69].

Керреброк А. (Kerrebrock A.) та співавтори досліджували розходження центромер у *Drosophila melanogaster* і, зокрема, мутації гена *mei-S332*, що викликають порушення процесу розділення центромер і феномен ПРЦ при мейозі в *Drosophila melanogaster*. Автори вважають, що протеїн *mei-S332* (масою 44 kD) бере участь у регуляції процесу розділення центромер. Дослідження *mei-S332*-мутантів популярні в дослідженнях мейозу *Drosophila melanogaster*. У деяких *mei-S332*-мутантів зафіксовано феномен передчасного розділення центромер (ПРЦ) під час мейозу, що настає до початку анафази II – ще в метафазі II, в результаті чого порушується регулярність в розходженні хроматид у другому поділі мейозу [152].

Бікель С. (Bickel S.) та співавтори, що теж працювали з *Drosophila melanogaster*, вирізняють так звані ORD-протеїни, що зв'язані з центромерними районами хромосом *Drosophila melanogaster* і, на думку авторів, беруть безпосередню участь у процесі розділення центромер. Автори, проте, не пропонують своєї схеми дії цих протеїнів. У той же час автори відмічають, що функція генів ORD не є принципово важливою для зв'язування чи розділення центромер і, очевидно, ці гени несуть допоміжну функцію при мейозі в *Drosophila melanogaster* [61].

Центромера вважається одним із найважливіших компонентів еукаріотичної клітини. Вважається, що саме центромері належить функція підтримки диплоїдності

клітини. Саме помилки в системі розділення центромер, зокрема, і передчасне розділення центромер (ПРЦ), призводить до утворення анеуплоїдних клонів, як під час різних неоплазій, так і в неопластичних тканинах. Згідно із уявленнями різних дослідників в функціонуванні центромери відіграють роль такі структури як кінетохор, прицентромерна ДНК, прицентромерний гетерохроматин [229].

Центромери відіграють важливу роль у процесі регуляції і функціонування клітинного циклу, вони є місцем прикріплення кінетохору, що в свою чергу з'єднується з мікротрубочками веретена. Центромери ссавців (і людини) суттєво відрізняються від центромер дріжджів, еволюція центромер йшла в бік компактизації [27]. Центромери ссавців відрізняються меншими розмірами і, очевидно, організовані більш раціонально. У сучасній літературі чітко розрізняють поняття «кінетохор» і «центромера». Під центромерою розуміють виключно регіон хромосоми з певною первинною структурою ДНК, що є інтегральною частиною хромосоми, є однією з основних конструкцій хромосоми – цього ДНК-гістонного комплексу. Прицентромерні райони складені з конституційного гетерохроматину. Центромера є пізньореплікуюча структура, що, очевидно, не кодує ніяких білків. Ділянка ДНК, що складає центромеру, становить довжиною біля 500 kb, але доцільніше розглядати центромеру комплексно, разом з сусідніми ділянками – «центромерним регіоном».

Для дріжджів район центромери характеризуються наявністю тандемних послідовностей величиною всього 5 bp, тобто повтору TTSSA.

Наявна в центромерах певна хромосом-специфічність. Виявлено в центромерах поліморфізм за сайтами рестрикції. Виявлено наявність в центромерах

структури, що отримала назву CEN. Вона складається з послідовності нуклеотидів довжиною 300 bp і містить три регіони: I та III регіони демонструють гомологічність. II регіон довжиною 84 bp на 90 % складається з пар А=Т [256, 278, 292]. Досі невідомо, яку роль відіграють ці послідовності в роботі центромер ссавців. Центромерні протеїни (CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-D, STNP-E) відіграють певну роль у процесі функціонування центромери. Відомо, що навіть у нормі центромери різних хромосом розділяються не одночасно, а в певній послідовності [276 - 279]. У людини найпершими розходяться центромери 18, 17, 2, 10, 12 хромосом. Потім розходяться центромери 21, 22, 13, 14, 15 хромосом. Інші центромери розходяться між цими двома групами. Вважається, що існує зв'язок між часом розділення центромер і кількістю прицентромерного гетерохроматину [277]. Вважається, що прицентромерний гетерохроматин є тим самим контролюючим елементом, що регулює механізм і час розділення центромер. І що порушення нормального перебігу процесу розділення центромер (тобто, власне, феномен ПРЦ) є причиною трисомій або є однією з причин неоплазій [278, 279].

Якщо дійсно центромера являє собою пізньореплікуючу ділянку ДНК хромосоми, і під час мітозу на стадії метафази ця ділянка не є реплікованою, то потім подається певна команда, і ця ділянка реплікується, починається процес розділення центромер. У цій події мітозу багато аспектів лишаються неясними і дискусійними. Вважається, що кінетохор чи його утворення не впливає на процес розділення центромер, що кінетохор бере участь виключно в подальшій динаміці хроматид, їх русі до полюсів клітини. Яким би не був істинний механізм розділення центромер, центромерна ДНК повинна мати особливі властивості, а саме: бути

здатною організувати кінетохор і лишатися спареною зі своїм гомологом в сестринській хроматиді до початку анафази.

Найбільш вивченим є процес розділення центромер у дріжджів. Довгий час дріжджі були модельним об'єктом для вивчення центромер, що дало дослідникам додаткових труднощів, бо дріжджі з низки причин виявились доволі незручним об'єктом для вивчення центромер. Виявилось, що властивості центромери обумовлені послідовністю ДНК довжиною 1 kb. Анафаза починається раптовим розділенням кожної хромосоми в точці з'єднання хроматид – в центромері. Це розділення не залежить від інших подій мітозу і відбувається навіть в хромосомах, що не прикріплені до мітотичного веретена. Це розділення центромер дозволяє полярним силам веретена, що діють на метафазну пластинку, почати повільний рух хроматиди до полюса клітини. Втримує хроматиди разом до початку анафази наступний механізм. Послідовність ДНК, що визначає центромеру, кодує спеціальний сигнал, що блокує її власну реплікацію в фазі S. Нереплікована ДНК центромери не дозволяє хроматидам розходитись, а запуск її реплікації призводить до розділення хроматид в анафазі [11].

Безпосередньо з центромерою зв'язаний кінетохор. Довгий час вважалося, що саме йому належить вирішальна роль в процесі розділення центромер. Кінетохор – це специфічна чотирьохшарова структура, що виконує функцію прикріплення мікротрубочок до спеціального сайту центромерного гетерохроматину.

З процесом розділення центромер певним чином пов'язана топоізомераза II та її інгібітори [146]. Виявилось, що α -топоізомераза II пов'язана не тільки з процесом розділення центромер, а також з процесом формування центромер-кінетохорних структур, з конденсацією

прицентромерного гетерохроматину. Слід, проте, зазначити, що ці закономірності виявлені лише під час мейозу в мишей, і питання про те, чи аналогічні явища мають місце і при мітозі, залишається відкритим [209, 229]. Важлива роль у процесі розділення центромер належить ферменту, що носить назву центромерна полімераза III. Точна схема чи модель роботи цього ферменту і механізми її регуляції залишаються досі невідомими. Без відповіді залишаються питання – чому власне розділення центромер відбувається точно регламентовано по часу, і які сигнальні механізми запускають процедуру розділення центромер [229].

Центромера в житті клітини виконує низку життєво важливих функцій під час мітозу та мейозу. Центромера активно забезпечує або служить точкою прикладення сил для:

1. Розташування хромосом в екваторіальній площині.
2. Орієнтації хромосом на веретені відносно полюсів ділення.
3. Переміщення хроматид до полюсів клітини.

Дуже важливим моментом у забезпеченні сегрегації хромосом є поздовжнє розділення хроматид в центромерному районі в чітко визначений момент у мітотичному циклі – на початку анафази. Передчасне розділення центромер сестринських хроматид призводить (або може призводити) до різкого порушення в розподілі хромосом і до виникнення таких аномалій як анеуплоїдія, поліплоїдія, ендоредуплікація [27].

Розділення центромер і весь клітинний цикл взагалі контролюється складними генетичними системами, для дослідження яких використовують пошук мутантних генів, що контролюють мітоз. Довший час найбільш популярним об'єктом для цих досліджень були дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Були виявлені мутантні клони, що чутливі до

підвищеної температури (ts). При підвищенні температури (вище 33°C) у цих мутантних клітинах різко порушувався нормальний мітотичний цикл, але вони мали нормальний мітоз при оптимальній температурі. Дослідження дозволили виявити 32 гени дріжджів, що контролюють процеси, які забезпечують нормальний мітоз. Мутації у цих генах, що отримали назву cdc, порушували етап клітинного циклу при підвищеній температурі. Причому, різні мутації є причиною порушення різних етапів мітозу чи клітинного циклу. В одних мутантів порушена здатність до каріокінезу, в інших – до завершення цього процесу, в третіх – порушений процес міграції ядра, в четвертих – процес цитокінезу і тому подібне. Дослідження взаємодій мутацій різних генів cdc дозволили дослідникам зробити низку висновків про те, які етапи в клітинному циклі дріжджів можуть контролюватися тими чи іншими генами cdc. Так, мутації генів cdc28, cdc4, cdc7 блокують клітинний цикл у фазі G1 до початку фази S. У мутантів cdc28, зокрема, не подвоюються центріолі, в мутантів cdc4 центріолі подвоюються, але копії не розходяться до полюсів. Цей підхід і ці дослідження дозволяють сподіватися, що в майбутньому, можливо, будуть виділені і досліджені всі регуляторні гени, що контролюють послідовність подій у мітозі і, можливо, будуть знайдені їх аналоги в клітинах людини та будуть ідентифіковані гени, що беруть участь у процесі сегрегації центромер.

У метафазі центромера містить відносно деспіралізований гетерохроматин і виглядає як незабарвлена перетинка, що надає характерного вигляду «талії» багатьом хромосомам у метафазі. Розділення хромосом завершується розділенням центромер: у цей час дочірні центромери взаємовідштовхуються і як би «відтаскують» хромосомні плечі до полюсів протягом анафазного руху. Метафазні хромосоми досліджують у

клітинах, які оброблені колхіцином, що порушує мікротубулярну структуру мітотичного веретена та збільшує нормальну конденсацію хромосом. Мітоз та клітинний поділ не продовжуються після порушення веретена. Але в пролонгованій культурі центромери все одно будуть розділені. Якщо розділені хроматиди лишилися асоційованими, вони будуть виглядати як ендоредупліковані хромосоми в наступній метафазі [104, 146].

У 1998 – 2000 роках у різних дослідників з'явилась нова хвиля зацікавленості центромерою, і в результаті нових досліджень з'явилося багато нових робіт [217, 202, 209, 282 та ін.], що змінили уявлення про центромеру та її роботу. Виникли принципово нові погляди на роботу системи центромера-кінетохор, згідно яких кінетохору належить ругулююча функція в процесі розділення центромер. Кінетохор функціонує у взаємодії з допоміжними протеїнами, що забезпечують його зв'язок з мікротрубочками веретена. Після цих досліджень вважається, що на етапі, коли кінетохор ще не зв'язаний з мікротрубочками веретена, він продукує спеціальний протеїновий сигнал, що в комплексі з іншими протеїнами забезпечує гальмування клітинного поділу (mitotic checkpoint). Після прикріплення кінетохору до мікротрубочок веретена здатність генерувати гальмування мітозу втрачається. Гіпотезу про наявність такого «сигналу чекання» або «гальмівного сигналу» розробили і перевірили Річард Макінтош та Конлі Рідер. Було досліджено динаміку поділу більш ніж 100 клітин і було виявлено, що час прикріплення різних хромосом набору до веретена суттєво відрізняється. Їх розділення завжди наставало протягом 20 хвилин після прикріплення останньої хромосоми. Вдалось встановити, що саме неприкріплені кінетохори є джерелом генерації оцього

«сигналу очікування»: з моменту руйнування лазером останнього неприкріпленого кінетохору починалось розділення хроматид, хоча процес лінійного впорядкування метафазних хромосом ще не був завершений. Була висунута гіпотеза про те, що протеїни mitotic checkpoint є обов'язковими елементами клітинного циклу. Було встановлено, що деякі білки кінетохору змінюються шляхом дефосфорилювання (втрати фосфорних груп) після прикріплення до мікротрубочок веретена [217].

Під час дослідження білків, що здатні викликати зміни в процесах мітозу, розділення центромер, була звернена увага на дві групи генів, що були ідентифіковані в дріжджів. Це гени *bub1*, *bub2*, *bub3* (перша група) і гени *mad1*, *mad2*, (друга група). Але хромосоми дріжджів відносно малих розмірів, ідентифікувати їх важко, тому робота з дріжджами, як модельним об'єктом дослідження роботи центромер тривалий час не давала результатів. Набагато більших успіхів було досягнуто під час роботи з клітинами ссавців і земноводних, коли їх почали використовувати як модельні об'єкти. Було виявлено білки MAD2 на неприкріплених кінетохорах жаби, ідентифіковано білки MAD2 людини [217].

Концентруючись на неприкріпленому кінетохорі, білок MAD2 залишав його після лінійного впорядкування метафазних хромосом. Аналогічний процес був виявлений і в кінетохорі мишей. Виявилось, що MAD2 безпосередньо бере участь в генерації «сигналу очікування». Значна концентрація цього протеїну на неприкріпленому кінетохорі є необхідною умовою гальмування клітинного поділу. Введення антитіл до MAD2 в культуру клітин нирок щуриноного кенгуру призводило до передчасного розділення центромер (ПРЦ) [217].

Роль протеїну MAD2 не обмежується його акумуляцією на неприкріпленому кінетохорі. Окремі його копії мігрують у цитоплазму, поширюючи «сигнал очікування» в клітині. Для поширення цього сигналу білок MAD2 асоціюється з іншим протеїном – білком p55CDC, тоді як під час дослідження клітин дріжджів подібна асоціація була вивлена щодо протеїну pCDC20. Цей дует функціонує сумісно з великим протеїновим комплексом, і назвали його циклосомою або по-іншому анафазно-промоторним комплексом (АПК). Активний АПК допомагає ініціювати анафазу шляхом каталізації дегенерації циклінів і протеїнів, що гальмують мітоз, крім того, активний АПК задіяний у розщеплення протеїнів, що втримують разом сестринські хроматиди. Присутність протеїну MAD2 утримує АПК від каталізування метафазно-анафазного переходу [217].

Після того, як всі кінетохори виявились прикріпленими до мікротрубочок веретена, «утримуючий сигнал» зменшується. Щоб це відбулось, необхідний механізм, що дозволяє кінетохору розпізнавати момент прикріплення до мітотичного веретена. Протеїн BUB сумісно з протеїном CENP-E, що задіяний у прикріпленні мікротрубочок до кінетохору, здатний вносити зміни в порядок сигнальних команд, що забезпечують гальмування мітозу і призводять до просування клітинного циклу вперед [217].

CENP-E, що асоційований з кінетохором – це свого роду молекулярний мотор, що дозволяє переміщувати хромосоми вздовж мітотичного веретена. Під час дослідження клітин ссавців були отримані докази того, що CENP-E задіяний у впорядкування хромосом на мітотичному веретені. Видалення CENP-E призводило до завершення мітозу до того, як хромосоми вкладалися в екваторіальній площині. До моменту готовності

хромосоми розділитись на сестринські хроматиди, протеїн BUB акумулюється в кінетохорі. Тут відбувається з'єднання BUB1 (що асоційований з BUB3) з CENP-E. Попереднє з'єднання CENP-E з мікротрубочками веретена призводить до певних змін його структур, що здатні в свою чергу змінювати функціональну активність BUB1, ймовірноше всього, шляхом дефосфорилування. За цим слідує інактивація MAD2, з'являється його нездатність до зв'язування з p55CDC і пригнічення активності анафазно-промоторного комплексу (АПК). У результаті цього мітоз продовжується далі. Виявилось, що BUB1 є раннім елементом патогенезу mitotic checkpoint у дріжджів [217].

Таким чином, кінетохор, крім того, що він асоціюється з молекулярним мотором, є генератором регуляторних сигналів, що забезпечують здійснення мітозу. Лишається невідомим, які зміни відбуваються в MAD2 після прикріплення кінетохору до веретена, який характер зв'язку між MAD2 та BUB-протеїнами [217].

Дві обставини суттєво обмежували розуміння механізму зв'язків та розділення центромер: відсутність інформації про сигнальні механізми, що запускають роз'єднання центромер на ранніх стадіях клітинного циклу і неможливість спостереження за розділенням центромер у дріжджів, які тривалий час були модельними об'єктами для генетичних досліджень клітинного циклу. Перша обставина була подолана після виявлення факту, що розділення центромер є обов'язковою умовою завершення мітозу. Виявилось, що ензими, які мітять цикліни для їх наступного розщеплення (АПК), також запускають деструкцію невідомих протеїнів, які утримують разом сестринські хроматиди за принципом клейоподібного зчеплення між ними. Друга обставина була подолана з розвитком методів локалізації специфічних повторів на хромосомах дріжджів, спочатку шляхом гібридизації *in situ*

на фіксованих клітинах, а потім методом флюорисцентної детекції ДНК-зв'язуюючих білків у живих клітинах. Ці методи були використані для дослідження мутантів з дефектами зчеплення і розділення центромер. Були знайдені протеїни Pds1 та Cut2 дріжджів, АПК-опосередковані зміни в яких є необхідними умовами для розділення центромер. Pds1 та Cut2 протеїни безпосередньо з хромосомами не зв'язуються, але доки вони зберігаються в нативній, нерозщепленій формі – розділення центромер не відбувається. Вважають, що їх роль полягає в перетворенні ензимів Esp1 та Cut1 в активні форми, що безпосередньо впливають на центромери [202].

Подальші дослідження дозволили встановити існування групи протеїнів, що здатні зв'язуватись між собою, утворюючи так званий **когезивний комплекс**. Це - мультиферментний комплекс, функція якого полягає в стабілізації з'єднання між сестринськими хроматидами під час реплікації. Якщо наявна функціональна неактивність одного з компонентів когезинового комплексу, відбувається передчасне розділення центромер (ПРЦ). Дві субодиниці когезинового комплексу Sms1 та Sms2 належать до родини АТФ-аз і відомі своєю здатністю змінювати трьохвимірну конфігурацію молекули ДНК. Вони задіяні в процесі найрізноманітніших хромосомних змін, включаючи конденсацію хромосом, з'єднання центромер, компенсацію дози генів. Інші компоненти когезинового комплексу ферментативною активністю не відрізняються. Одна з субодиниць цього комплексу – Scc1 (Mcd1) дисоціює під час розділення центромер, але тільки при наявності активної форми Esp1. Ці дані свідчать про те, що когезивний комплекс утримує центромери разом, а його руйнування чи видалення запускає розділення центромер. З'єднання між центромерами виникає під час

реплікації, узгоджено прогресуючи з просуванням реплікаційної вилки [202].

Розділення центромер відбувається після розщеплення *Scc1* на три фрагменти і видалення цього протеїну з хроматину. Було встановлено, що ця реакція відбувається під дією *Esp1* та інгібується *Pds1*. Мутантна форма *Scc1* зберігала здатність втримувати центромери разом після реплікації, але не розщеплювалася і не видалялася з хроматину в мітозі, наслідком чого була загибель клітин з центромерами, що розділились. Таким чином, розділення центромер в мітозі є результатом подвійного протеолізу: активація АПК призводить до деструкції *Pds1*, що дозволяє *Esp1* зруйнувати когезивний комплекс шляхом подвійного розривання *Scc1* [202].

Зміни в субодинацях когезинового комплексу визначають відмінності розділення центромер у мітозі та мейозі. У мітозі розділення центромер та хромосомних плечей відбувається одноетапно, тоді як під час першого поділу мейозу розділяються тільки плечі сестринських хроматид, а розділення центромер відбувається лише під час другого поділу мейозу. Дослідження механізмів розділення центромер під час мітозу та мейозу показало багатоваріантність регуляції роботи *Esp1* навіть в межах одного організму. Зокрема, відсутність феномену передчасного розділення центромер (ПРЦ) у дріжджів з дефіцитною мутацією секурина *Pds1* вказує на інший механізм подавлення активності *Esp1* у дріжджів [209].

У багатоклітинних організмів розщеплення когезину, можливо, відбувається більш складним шляхом, аніж у дріжджів. Якщо в дріжджів когезин присутній у хромосомі геть аж до анафази, то в клітинах *Xenopus* його дисоціація відбувається вже на стадії профазі. Це дозволяє вважати, що присутність залишкової фракції когезинового комплексу на хромосомах, або наявність в еукаріот інших

білків, що забезпечують з'єднання центромер до анафази мітозу. Залишаються відкритими багато питань, що пов'язані з функціональною активністю Esp1 у вищих еукаріот, і, зокрема, чи є Esp1 протеазою, і чи задіяний він в протеолізі Scc1, на якій стадії мітозу відбувається розщеплення Scc1 у вищих еукаріот, чи бере участь Esp1 у видаленні когезину в профазі, яким чином відбувається подавлення ефективності Esp1 секуринами до активації АПК і чи є розщеплення залишкових одиниць когезинового комплексу процесом, що має в якості посередника Esp1 і активується АПК [209].

Онкотрансформовані клітини демонструють картину хромосомної нестабільності і анеуплоїдії, що наводить на думку про вагомую роль порушень мітотичного розподілу хромосом у патогенезі раку. Деякі клітинні лінії пухлин товстого кишківника, для яких характерна хромосомна нестабільність, несуть мутації гена BUB1, що беруть участь у затримці настання анафази шляхом блокування активності АПК. Оскільки впорядковане зчеплення і розділення центромер є обов'язковою умовою нормального розподілу хромосом у мітотичній клітині, дефекти зчеплення можуть реалізуватися в хромосомній нестабільності і раковій трансформації. Характерні особливості людського секурина РТТГ свідчать на користь цієї гіпотези [215, 209, 92, 180, 122, 242]. РТТГ був ідентифікований завдяки особливостям його експресії в пухлинах гіпофізу. Суперекспресія РТТГ гальмує клітинний поділ у зв'язку з його участю в затримці розділення центромер, за чим може послідувати порушення нормального порядку розподілу хромосом в мітозі та до появи анеуплоїдії хромосомних наборів дочірніх клітин. Як результат онкогенного ефекту суперекспресії РТТГ розцінюється відсутність подавлення клітинного росту онкотрансформованих фібробластів у

м'якому агарі і формування пухлин під час введення РТТГ мишам. Лишається невідомим, чи допомагає нова інформація про механізми розділення центромер розробити нові методи лікування раку [209].

Чи можна вважати, що знайдений фізичний молекулярний клей, що втримує сестринські хроматиди і центромери разом? Чи є Esp1 протеазою, що руйнує зчеплення центромер? Цілком імовірно. Можливо, когезивний комплекс регулює стабільність іншого, більш фундаментального зв'язку між центромерами. Підтвердженням цього є дані досліджень екстрактів яйцеклітин жаби. Ці дані свідчать, що розщеплення когезинового комплексу і його видалення з хроматину відбувається на самому початку мітозу, задовго до розділення центромер. Є підстави для сумнівів у здатності Esp1 безпосередньо розщеплювати когезиновий комплекс, бо він не має гомології ні з однією з відомих протеаз [202].

16. Феномен передчасного розділення центромер при різних патологіях

У нормі, в нормальних здорових клітинах молодих здорових людей феномени ПРЦ та С-анафази зустрічаються надзвичайно рідко – поодинокі [17, 154].

Доведено, що феномен ПРЦ пов'язаний з цілою низкою захворювань, зокрема з хворобою Альцгеймера [192]. Припускають, що феномен ПРЦ пов'язаний з процесом пошкодження хромосом і таким чином може бути залучений в патогенез хвороби Альцгеймера [66, 154]. Одночасно в людей, що страждають на хворобу Альцгеймера, крім феноменів ПРЦ та С-анафази виявлено поліплоїдні клони клітин та анеуплоїдні, що навело на думку про зв'язок між цими аномаліями і феноменом ПРЦ

[154]. Вважається, що феномени ПРЦ та С-анафази пов'язані з процесом старіння клітин, а не з самим патогенезом хвороби Альцгеймера [66]. Було виявлено наявність підвищеної частоти появи клітин з довгими ацентричними фрагментами у жінок з хворобою Альцгеймера. Появу цих фрагментів теж пояснюють феноменом ПРЦ [197].

Чамла І. (Chamla Y.) проаналізував випадки, коли дослідники під час цитогенетичних досліджень стикалися з феноменами ПРЦ та С-анафази. Такі випадки він класифікував наступним чином:

1. Мутації, що обумовлюють резистентність до колхіцину.
2. Вади конституції хромосом.
3. Люди похилого віку (старіння клітин).
4. Хвороба Альцгеймера.
5. Синдром Робертса [74].

Чамла виявив домінантні мутації стійкості до колхіцину, що обумовлюють окремі випадки стійкості до колхіцину – вони викликають появи в клітинах феномену С-анафази. Але ці мутації рідкісні і вони, звичайно, не можуть пояснити всіх випадків спостережень С-анафази [74].

Було зареєстровано високий рівень С-анафази в сім'ях з хондродистрофією. У цих хворих крім С-анафази одночасно реєструвався високий рівень різних хромосомних аномалій – тетраплоїдії та мітотичні агрегації хромосом [74].

Було виявлено високий рівень ПРЦ при множинному склерозі. Припускається, що феномен ПРЦ пов'язаний з патогенезом цієї хвороби і з процесом старіння клітин при цій патології [40].

У хворих на анемію Фанконі (патології, яка викликається мутацією генів, що контролюють процес

репарації ДНК) відмічено високий рівень ПРЦ, що особливо часто зачіпав 13, 14, 15 хромосоми.

На початку 1990-их років було висунуто припущення, що феномен ПРЦ може бути одним із перших проявів хромосомної нестабільності, пов'язаний з ризиком потенційної малігнізації [181 – 185]. Було описано прояв явища ПРЦ хромосоми 3 у новонародженої дівчинки з водянкою плоду та її здорового батька, які обидва були носіями сімейної збалансованої транслокації $t(3p;19q)$ [181]. Вважається, що цей факт підтверджує припущення, що феномен ПРЦ не є випадковим і пов'язаний з хромосомним мутагенезом [182]. Було описано високий рівень ПРЦ (20,5 %) у жінки зі спонтанними абортами, що має дитину з синдромом Дауна [183]. Феномен ПРЦ безпосередньо розглядають, як основну причину появи анеуплоїдних клонів при вищеперелічених патологіях [184]. Відмічено підвищений рівень ПРЦ при туберозному склерозі в клітинах фібробластів із шкірних вузлів [227]. Виявлені підвищені рівні ПРЦ у дітей з аутизмом. Високі рівні ПРЦ пояснюють внутрішньоклітинним дефіцитом фолієвої кислоти [43]. Було виявлено і спадкові варіанти високих рівнів ПРЦ, коли висока частота цього феномену передається по спадковості. При цьому в цих сім'ях відмічені аномально високі рівні анеуплоїдії [182]. На основі цих даних дослідники прийшли до висновку, що феномен ПРЦ призводить до підвищення частоти нерозходження хромосом в мітозі та мейозі [41].

Підвищення рівня ПРЦ фіксували при туберозному склерозі, хондродистрофії, фіброматозі, псоріазі та багатьох інших патологіях сполучної тканини. Описано високий рівень ПРЦ у хворої на спадкову форму дискератозу і зафіксовано в цієї хворої близькі показники рівня ПРЦ до показників у хворих на анемію Фанконі [148]. У хворих на псоріаз рівень ПРЦ в культурі

лімфоцитів крові становить в середньому 10 %. Було запропоновано дослідження ПРЦ в якості додаткового тесту для діагностики латентного псоріазу. При псоріазі відмічається підвищений рівень інших хромосомних аномалій – поліплоїдів, анеуплоїдів – як в клітинах культури лімфоцитів периферійної крові, так і в культурі фібробластів шкіри [171]. У хворих на туберозний склероз виявлено одночасно високий рівень ПРЦ та високий рівень тетраплоїдних клітин [91]. Феномен ПРЦ зустрічається при мейозі в *Drosophila melanogaster* у мутантних лініях meiS332. Було зафіксовано факт, що ПРЦ в метафазі II мейозу призводить до порушення регулярності розділення хромосом у другому поділі мейозу і як наслідок – до підвищення частоти нерозходження хромосом. Дослідження meiS332-мутантів дозволило зробити висновок про генетичний контроль над процесом розділення центромер і його порушення – як одну з причин феномену ПРЦ [152].

Передчасне розділення центромер X-хромосоми (ПРЦ-X) було ідентифіковано в 48-річній жінки з розумовою відсталістю. Ця хвора мало каріотип 46,XX у переважної більшості клітин, але 13 % клітин були анеуплоїдними в зв'язку з надлишковою X-хромосоною, або з втратою однієї X-хромосоми. У цьому випадку всі клітини – і ортоплоїдні, і ануплоїдні демонстрували ПРЦ X-хромосоми [99]. Вважається, що ПРЦ-X пов'язане з нерозходженням X-хромосоми по дочірнім клітинам і викликає появу анеуплоїдних клонів клітин – як мінімум в соматичних клітинах [86].

Дослідники схиляються до думки, що передчасне розділення центромер проявляється в нерегулярності центромерної поведінки, це може бути результатом або причиною неправильного прикріплення хромосоми на мітотичному веретині, результатом чого було б

нерозходження хромосом або недорозходження і утворення клітин, що мали б або втрачену, або набуту X-хромосому [99]. Припускається, що причинний взаємозв'язок між ПРЦ-X та анеуплоїдією визначається самою наявністю їхньої асоціації, що була виявлена і в людей похилого віку з групи нормальних здорових людей [99]. Було виявлено підвищений рівень ПРЦ в лімфоцитах периферійної крові в людей хворих на алкоголізм та наркоманію [20]. Виявлено наявність феномену ПРЦ при контрактурі Дюпюїтрена – захворюванні сполучної тканини, що проявляється в проліферації клітин і надлишковому синтезі колагену долонь і підощв. Крім феномену ПРЦ в аномальних клонах клітин при цьому захворюванні виявлена трисомія 7 та 8 хромосом. Вважається, що патогенез цього захворювання пов'язаний з нестабільністю набору цих хромосом [278].

Виявлено феномен ПРЦ при синдромі Робертса, але при цій аномалії поведінка центромер своєрідна: центромери ніби взаємовідштовхуються з утворенням характерних тільки для цієї аномалії структур, має місце процес не розходження центромер, а відштовхування центромер [74].

17. Феномен передчасного розділення центромер метафазних хромосом при онкологічних захворюваннях

Феномен ПРЦ був зафіксований під час патогенезу низки онкологічних захворювань, зокрема, при гемопроліферативних захворюваннях (гемобластозах різних типів). Феномен ПРЦ простежується при хронічному мієлобластному лейкозі (ХМЛ) [279], при гострому мієлобластному лейкозі (ГМЛ) [255]. Феномен

ПРЦ було виявлено і в клітинах червоного кісткового мозку, і в периферійній крові пацієнтів з солідними пухлинами та при rh^+ ХМЛ [43]. Підвищений рівень ПРЦ виявлено одночасно з високим рівнем аберацій хромосом: уламків хромосом, фрагментацій, ерозій хромосом, деспіралізацій. Після початку терапії відмічається елімінація вищезгаданих аномалій. Відмічається посилення цих аномалій під час застосування арабінозиду цитозину, що пояснюють нездатністю цієї сполуки інкорпоруватися в ДНК [54]. Зазначається, що феномен ПРЦ проявляється значно на більш високому рівні під час застосування арабінозиду цитозину, аніж у випадках фолат-дефіцитної анемії [54]. З підвищенням рівня ПРЦ пов'язаний саме внутрішньоклітинний дефіцит фолатів: фолієва кислота, що є донором метилового радикалу в процесі метилювання ДНК, бере участь в метилюванні прицентромерних районів хромосом, що особливо потребують цього, як регіони, особливо багаті на цитозин. Внутрішньоклітинний дефіцит фолатів викликає порушення процесу метилювання ДНК прицентромерних районів, що в свою чергу зменшує стабільність ДНК цих районів хромосом, що і може призводити (і призводить) до феномену ПРЦ [54]. Вважається, що аномалії в прицентромерних районах хромосом обумовлені саме порушенням метилювання ДНК. Гіпометилювання прицентромерних районів хромосом викликає нестабільність гетерохроматину, що в свою чергу спричинює підвищення частоти різних прицентромерних аномалій хромосом. Під час досліджень цих процесів використовувалися такі інгібітори метилювання як 5-азадеоксицитидин та 5-азацитидин. Після застосування цих інгібіторів було відмічено збільшення частоти прицентромерних аномалій в 1 хромосомі [137].

Наявність феномену ПРЦ при гострому мієлобластному лейкозі виявлено в клітинах червоного кісткового мозку хворого на ГМЛ як *in vivo*, так і в культурі клітин – після 24 годинного культивування, в тому числі і в синхронізовані метотриксатом. ПРЦ охоплює 1 – 14 хромосом клітини і більш поширене в культурі несинхронізованих клітин (32 %), аніж у культурі клітин синхронізованих метотриксатом (17 %). Зазначається, що в хворих на ГМЛ рівень фолатів і вітаміну В12 був у нормі, але не виключається можливість внутрішньоклітинного дефіциту в цих випадках. Виявлено паралельну димаміку росту рівня ПРЦ з ростом рівня патологічних бластів у червоному кістковому мозку. Вважається, що феномен ПРЦ може бути причиною анеуплоїдії, втрати хромосом клітинами, виникнення гіпоплоїдних клонів клітин ГМЛ [94]. Наявність феномену ПРЦ при ГМЛ досліджено до початку терапії і в період ремісії. Найбільший рівень ПРЦ зафіксували в червоному кістковому мозку хворого до початку лікування (60 % метафаз демонстрували ПРЦ). У периферійній крові до початку терапії виявлено тільки 4 % метафаз з ПРЦ. Рівень ПРЦ зменшився до 0 % при досягненні хворим ремісії. Вважається, що феномен ПРЦ є новим критерієм діагностики і моніторингу перебігу ГМЛ [144]. Слід зазначити, що ці дослідження були проведені на малій вибірці (1 – 2 пацієнти). Тому необхідні дослідження на великій вибірці хворих для більш детальних досліджень і ширших узагальнень та висновків. Але після цих досліджень вважається, що феномен ПРЦ є новою типовою аномалією при ГМЛ [279]. Потім феномен ПРЦ було виявлено в хворих на нетипову гіпопластичну анемію, яка пізніше розвинулась в ГМЛ. Цей факт дозволив висунути припущення, що феномен ПРЦ передуює клінічній маніфестації лейкозу. Зафіксовано феномен ПРЦ

у 3 з 28 пацієнтів з нетиповою формою анемії, що пізніше розвинулась в ГМЛ. Феномен ПРЦ фіксували в лейкомічних клітинах, цей феномен зникав при досягненні пацієнтами ремісії та знову виникав при рецидивах захворювання [255]. Після цих досліджень вважається, що феномен ПРЦ є типовим, характерним явищем для онкотрансформованих клітин (cancer cell). Явища ПРЦ та передчасної конденсації хромосом (ПКХ) одночасно відмічалися при різних формах лейкозів в бластних клітинах [123].

Доведено, що феномен ПРЦ має місце і при гострому лімфобластному лейкозі (ГЛЛ). Дослідники прийшли до висновку, що феномен ПРЦ пов'язаний з бластним клоном при ГЛЛ [112]. Але ці дослідження теж були проведені на малій вибірці і потребують більш широких узагальнень і відповідної статистичної обробки. Не дослідженим довгий час лишалося питання і прогностичного значення ПРЦ та С-анафази при різних онкологічних захворюваннях. Досі не досліджувалось питання, як пов'язаний феномен ПРЦ та С-анафаза з процесом апоптозу при гострих лейкозах та лімфомах.

18. Апоптоз як регулятор клітинного гомеостазу

У будь-якому багатоклітинному організмі підтримка клітинного гомеостазу в тканинах і органах забезпечується складною динамічною рівновагою між процесами проліферації, диференціювання, старіння та відмирання чи раптової загибелі клітин. Під апоптозом розуміють процес наперед запрограмованого відмирання клітин. Розрізняють нормальний та індукований апоптоз. Індукований апоптоз виникає як наслідок дії низки різних хімічних речовин – індукторів апоптозу (таких як метил-тетраіарі-бутиловий

ефір та ін.) [280, 248]. Деякі бактерії, зокрема, *Helicobacter pilovi* здатні впливати на систему регуляції проліферації та апоптозу в клітинах епітелію шлунка. У різних джерелах зазначається, що дія цих бактерій на систему регуляції апоптозу є фактором ризику розвитку пухлини шлунка [280]. Явище апоптозу фіксується при лейкозах, особливо гострих – як під час хіміотерапії, так і в будь-якому періоді перебігу хвороби – в меншій мірі під час гострого періоду [281]. При лейкозах на апоптоз впливають різні внутрішньоклітинні фактори, в тому числі фактори росту GF та SGF, гранулоцит-колонієстимулюючий фактор при ГЛЛ [204]. Різні препарати хіміотерапії, зокрема, преднізолон індуюють апоптоз серед бластних клітин при ГЛЛ. Апоптоз у нелікованих хворих при ГЛЛ значно менш досліджено [234]. Вважається, що саме резистентність бластних клітин до індукованого апоптозу при ГЛЛ є однією з причин рецидивів захворювання [127]. Поширеним методом визначення рівня апоптозу є метод визначення фрагментації ДНК, але вважається, що цим методом вдається визначити далеко не всі клітини, які вступили в апоптоз [178]. Високі рівні апоптозу виявлені при хворобі Годжкіна [173] і при негоджкінських лімфомах [215]. Важливість вивчення апоптозу щодо дослідження, діагностики, прогнозу і лікування онкологічних захворювань усвідомили тільки в 1990-их роках ХХ століття, а до того взагалі панувала думка, що загибель клітин відбувається в результаті або випадкових пошкоджень, або старіння. Але потім було встановлено, що в кожній клітині організму закладена певна генетична програма, реалізація якої призводить до загибелі клітини. Запрограмовану загибель клітини (яку назвали апоптозом) стали відрізняти від патологічної загибелі клітин або некрозу. Відкриття феномену апоптозу, тобто самоліквідації клітини, вважають революційним

відкриттям і співставляють за значенням з відкриттям клітинного циклу. Відкриття апоптозу спонукало дослідників переглянути свої погляди на низку проблем онкогенезу, ембріогенезу, на процеси пухлинного росту та онкотрансформації.

Поступово став загальноновизнаним факт, що клітини тканин багатоклітинних організмів припиняють свою життєдіяльність згідно із чітко визначеною програмою. Було виявлено гени, продукти яких перешкоджають апоптозу, і гени, продукти яких прискорюють чи викликають цей процес. Були встановлені найбільш важливі етапи апоптозної загибелі клітин, як на молекулярному рівні, так і на рівні змін субклітинних структур. Доведено, що процес апоптозу носить незворотний характер і не являється наслідком простого пошкодження клітин. Найбільш масово клітини гинуть шляхом апоптозу під час ембріогенезу, тому вперше ідею існування апоптозу було висловлено під час дослідження ранніх етапів ембріогенезу хребетних. Було висловлено думку, що в період морфогенезу активується спеціальний механізм, направлений на елімінацію надлишкових та аномальних клітин. Пізніше подібний механізм суїциду клітин описаний в безхребетних тварин [155]. Було прийнято постулат, що елімінація клітин запускається внаслідок активації генетичної програми. Пізніше було доведено глобальне поширення явища апоптозу серед багатоклітинних організмів, яке виконує роль підтримки оптимального числа клітин в тканинах і органах. Цитологічні зміни під час запрограмованої загибелі клітин були описані Керром Дж. (Kerr J.) та співавторами – вони, власне, і запропонували термін «апоптоз» (у буквальному перекладі з давньогрецької *απόπτωση* – опадання). Загалом, визначення апоптозу набуло значення запрограмованої загибелі клітин, що відбувається в нормальних та

патологічно змінених тканинах багатоклітинних еукаріот, при якій клітини відіграють активну роль у власному знищенні [248].

Але пізніше почали розрізняти поняття «апоптоз», «фізіологічна смерть клітини» та «запрограмована смерть клітини». Поняття «запрограмована смерть клітини» було запропоноване дослідниками, що вивчали повний метаморфоз комах, і під цим терміном стали розуміти механізм елімінації клітин, що активується під час формування органів, тканин і структур дорослого організму в період ембріогенезу та морфогенезу. Під «фізіологічною смертю клітини» розуміють загибель клітини внаслідок старіння. Вважається, що запрограмована чи фізіологічна смерть клітини не завжди здійснюється шляхом апоптозу. Тому під апоптозом розуміють самознищення клітин в результаті дуже конкретних механізмів та програм [134].

Апоптоз характерний для проліферуючих клітин в період формування гормонозалежних органів, після лактації чи в інших подібних випадках. Явище апоптозу в нормі має місце в імунній системі – при елімінації аутореактивних Т-лімфоцитів в тимусі і під час селекції В-лімфоцитів [155]. Шляхом апоптозу можуть еліминуватися нейтрофіли та мегакаріоцити, що не здатні надалі нормально виконувати свою функцію [173]. У нормі фрагменти апоптичних клітин фагоцитуються макрофагами. Крім нормального апоптозу можливий патологічний апоптоз, що може призвести до руйнування тканин, до подальшого некрозу тканин або розвитку запальних процесів. Патологічний апоптоз може бути викликаний різними біотичними факторами, в тому числі дією бактеріальних токсинів.

Апоптоз був виявлений практично в усіх злоякісних пухлинах або злоякісних клонах клітин, хоча фактори, що

його викликають можуть бути дуже різними: різноманітні хімічні речовини, цитотоксичні Т-лімфоцити, різноманітні мутагени, канцерогени та ін. У злоякісних пухлинах одночасно наявні процеси і апоптозу, і некрозу. На ранніх етапах онкогенезу рівень апоптозу є низьким, а потім невпинно зростає. Очевидно, що функція апоптозу полягає, крім іншого, в збереженні генетичної стабільності клітин організму, елімінації мутантних клітин.

Апоптоз є генетично запрограмованою подією, ідентифіковані конкретні гени, що контролюють чи викликають апоптоз, але в процесі запуску апоптозу беруть участь позаклітинні фактори: апоптоз може індукуватися різними фізичними, хімічними чи біологічними чинниками – іонізуючим випромінюванням, гормонами, спеціалізованими клітинними антигенами, дефіцитом глюкози, азидами, вірусами, інтерферонами, антионкогеном p53, експресією генів c-myc або E1A в умовах дефіциту цитокінів та ін.

Деякі позаклітинні фактори можуть навпаки, супресувати апоптоз. До таких факторів належать експресії генів bcl-2, mdm-1, T24-ras, v-c-myc, гена теломерази, інгібітори синтезу РНК, інгібітори синтезу білків та ін. Наявність такого великого числа факторів, що індукують чи навпаки супресують апоптоз, наводить на думку, що існує багато різних механізмів регуляції апоптозу.

Апоптичні клітини мають низку характеристик, що дозволяють простежувати різні стадії розвитку апоптозу. До морфологічних характеристик належать так зване «брунькування» клітин з утворенням компактних апоптозних тілець, що обмежені клітинною біліпідною мембраною і містять цілісні органели, наявна висока конденсація ядерного матеріалу. Саме цим апоптичні клітини суттєво відрізняються від некротичних клітин, де цілісність хроматину та органел суттєво порушена. До

біохімічних характеристик апоптозу належить розщеплення ендонуклеазами двониткової ядерної ДНК. Відбувається фрагментація ДНК трьох типів:

1. Розщеплення в середині нуклеосом.
2. Фрагментація на великі ділянки розміром 50 – 300 kb.
3. Однониткові розриви ДНК.

У процесі фрагментації ДНК беруть участь ДНКаза I, ДНКаза II, циклофілін А, ендонуклеаза NUC18. У різних клітинах, при різних типах фрагментації ДНК беруть участь різні нуклеази, кілька одночасно.

Була досліджена низка сигнальних систем, функціонування яких різко змінюється при апоптозі. Зокрема, виявлено збільшення рівня йонів кальцію в цитозолі, накопичення цАМФ, активація протеїнкіназ, продукція цераміду, активація тирозинспецифічних протеїнкіназ. Щодо нематод, були ідентифіковані гени *ced-3* та *ced-4*, продукти яких індукують апоптоз. У той же час активація гена *ced-9* апоптоз блокує. Гомологи цих генів знайдені в ссавців і отримали назву генів ICE. Продукт гомологу гена *ced-3* подібний до цистеїнової протеїнкінази, яка розщеплює попередник інтерлейкіну 1- β -IL-1b з утворенням зрілої форми цього цитокіну. Відомо, що білок 1- β -IL-1b є одним із головних посередників у біологічній відповіді клітин на мікробну інфекцію, імунологічну реакцію та на пошкодження тканин. Вважається, що в процесі еволюції клітини виробили спеціальний механізм самоліквідації за допомогою апоптозу у відповідь на вірусну інфекцію для запобігання поширення вірусу. Ще один гомолог *ced-3* кодує апопаїн – цистеїнову протеїназу, мішенню якої є полі-АДФ-рибозополімераза, що відіграє важливу роль в процесах репарації ДНК завдяки здатності негативно регулювати активність Са-Mg-залежної ендонуклеази, що забезпечує міжнуклеосомне розщеплення ДНК. Ця подія є

центральною подією апоптозу. Апопаїн складається з двох субодиниць (17 та 12 kD), які утворюються зі спільного протеїну-попередника CPP32. Вивчення структури цього протеїну дозволило створити його альдегідний інгібітор, що супресує апоптоз *in vitro* [29].

Активатором апоптозу є гіперекспресія гена ICE в клітинах щурів лінії Rat-1, а при одночасній гіперекспресії гена *bcl-2*, що є гомологом гена *ced-9* у ссавців, активації апоптозу немає. Загалом доведено, що ген *bcl-2* є одним з центральних у регуляції апоптозу. Гіперекспресія цього гена спостерігається при В-клітинних формах лейкозів та лімфом. У людини цей ген локалізований в 18-ій хромосомі в області 18q21. Внаслідок транслокації, в яку залучена область 14q32, де знаходяться сильнодіючі інхансери генів важких ланцюгів IgH, відбувається бластна трансформація В-клітин. Одночасно експресія цього гена перешкоджає апоптозу. Як бачимо, проблеми дослідження онкогенезу лейкозів та проблеми дослідження апоптозу перетинаються і мають чимало спільних точок.

Більш детально характеризуючи протеїн *bcl-2* (молекулярна маса 26 kD), слід зауважити, що він є унікальним за своєю структурою: біля –COOH кінця він має ділянку, що складається з 19 гідрофобних амінокислот, що дозволяє йому асоціюватися з плазматичною мембраною, ендоплазматичним ретикулюмом, зовнішньою оболонкою мітохондрій. Саме з цим фактом і пов'язують процес втрати йонів Ca^{2+} під час апоптозу [234]. Імовірно, що цей протеїн пов'язаний з процесами окислювального фосфорилування. Клітини, де активно транскрибується *bcl-2*, є стійкими до дії різних індукторів апоптозу, таких як p53 чи p62 c-мус. Протеїн *bcl-2* може діяти сумісно з протеїнами *gas* та *raf*-кіназою, посилюючи їх вплив як інгібіторів апоптозу. Слід зазначити, що функція *bcl-2* до кінця не з'ясована. Є версія, що цей білок в нормі

пов'язаний з процесами репарації ДНК: можливо, що у випадку пошкодження ДНК він перешкоджає транскрипції генів, що беруть участь в апоптозі [250].

Процес апоптозу пригнічує ген *mrd-1*. Його гіперекспресія спостерігається в деяких онкотрансформованих клітинах, які мають підвищену стійкість до апоптозу, що викликається хімічними речовинами. Очевидно, що функція цього гена полягає в зниженні внутрішньоклітинної концентрації цих речовин [280].

Протеїн безпосередньо p53 пов'язаний з апоптозом. Він інтенсивно синтезується в клітинах, але швидко деградує. Якщо в клітині відбувається пошкодження ДНК, деградація цього протеїну припиняється, і він починає активно діяти. Якщо пошкодження ДНК має масштабний характер – індукується синтез білків, що вмикають механізм апоптозу, якщо ж пошкодження ДНК незначне – індукується синтез білків, що блокують дію циклінів, зупиняючи клітинний цикл, що дозволяє працювати ферментам репарації ДНК. Аналогічно діє протеїн p53 у випадку інвазії вірусу – розмноження інфікованих клітин блокується шляхом зупинки дії циклінів. Мутантна форма протеїну p53 не має здатності зупинити клітинний цикл [234].

З процесом апоптозу пов'язаний білок p34-cdc-2 – серин-треонін-специфічна протеїнкіназа – продукт гена *cdc-2*. Функція цього протеїну – запуск процесів біосинтезу ДНК в фазі G1 клітинного циклу – тобто перехід у фазу S. Передчасна активація цього протеїну індукує апоптоз лімфоїдних клітин [248]. Встановлено, що апоптоз відіграє вирішальну роль під час селекції Т-лімфоцитів у тимусі. Ця селекція відбувається за допомогою Fas-системи (Fas-ліганд- Fas-рецептор), яку ще називають системою АРО-1. Рецептор Fas (молекулярна

маса 45 kD) експресується мієлоїдними клітинами, Т-лімфобластами, фібробластами. Гіперекспресія виявлена в зрілих лімфоцитах та в лімфоцитах, що трансформовані вірусами HTLV-1, HIV, EBV. Ліганд Fas (молекулярна маса 40 kD) виділений вперше з цитотоксичних Т-лімфоцитів, міститься в плазматичній мембрані апоптичних клітин. Можливо, і апоптоз пухлинних клітин під дією цитотоксичних Т-лімфоцитів відбувається саме за системою Fas-ліганд-Fas-рецептор – пухлинні антигени клітин-мішеней активують ефektorні клітини, індукуючи в них експресію Fas-ліганду, що зв'язується з рецептором і запускає механізм апоптозу.

У регуляції системи апоптозу важливу роль відіграє теломераза – фермент, що забезпечує відновлення довжини теломерної (кінцевої) ділянки хромосомної ДНК. Кожна хромосома має на своїх кінцях теломери – особливі структури, що містять більше тисячі нуклеотидних повторів TTGGGA. Під час реплікації ДНК-полімераза не здатна забезпечити реплікацію кінцевих нуклеотидів. З кожним поділом кожна лінійна хромосома стає коротшою на 10-20 теломер. Після досягнення певної критичної довжини теломера перестає виконувати свої захисні функції, і в хромосомі відбуваються руйнування життєвоважливих ділянок ДНК. Клітина гине. У більшості нормальних соматичних клітин теломераза або неактивна, або малоактивна, тому клітини можуть підпадати під апоптоз через 50-100 поділів. У злоякісних клітинах ген теломерази активний, і тому час життя злоякісних клітин не обмежений. Ген теломерази активно експресується в одноклітинних еукаріот, в ембріональних клітинах, гоноцитах (клітинах зародкової лінії) – клітинах, які є теоретично вічними. Щоправда, багато дослідників нині вважають загибель клітин, що відбувається завдяки малій активності теломерази, зовсім іншою формою загибелі і не

поширюють на таку форму смерті клітин термін «апоптоз».

Більш складними є механізми аноїкозу – процесу, під час якого клітини, що втратили контакт зі своїми сусідами, стають на шлях апоптозу. Тут задіяні компоненти позаклітинного матриксу та їх специфічні рецептори (інтегрини) поверхні клітин. Виключення цих рецепторів індукує апоптоз.

19. Паралельна реєстрація індукції апоптозу і цитогенетичних варіантів клітинної конституції

У багатьох роботах вказуються внутрішньоклітинні фактори, що одночасно є індукторами апоптозу і пов'язані з розділенням центромер. Доведено, що білки CENP, що безпосередньо пов'язані з функціонуванням центромери, пов'язані з явищем апоптозу. Було виявлено, що протеїн CENP-C пов'язаний з індукцією апоптозу – клітинна лінія мишей DT-40 з мутантним геном CENP-C має підвищену здатність до апоптозу за певних умов, і апоптоз настає під час метафазно-анафазного переходу [104]. Виявлено, що білок CENP-A пов'язаний з індукцією апоптозу, і ця індукція відбувається на рівні центромери [213].

Доведено, що топоізомераза, що задіяна в процес розділення центромер, безпосередньо пов'язана з явищем апоптозу [229, 213]. Апоптозні клітини при медулобластомі мають низку цитогенетичних характеристик, аналогічних до ембріональних клітин, для яких в тому числі характерне явище С-анафази [229]. Еруцилфосфохолін призводить до утворення і акумуляції тетраплоїдних клітин і одночасно до формування бінуклеарних і полінуклеарних клітин та індукції апоптозу

[238]. Процеси метилування і фосфорилування пов'язані з явищем апоптозу і одночасно з процесом розділення центромер [213]. Ще не так давно центромеру вважали чимось другорядним щодо таких процесів як апоптоз, старіння клітин, онкотрансформація, утворення «безсмертних» клонів клітин клітинної популяції. Більшу увагу приділяли теломерам та їх ролі в вищезгаданих процесах. Зараз думка багатьох дослідників змінилася, і навіть ставиться питання – хто чим керує, хто є головним у процесі регуляції проліферації та апоптозу – центромера чи теломера? [238].

Деякі підсумки вищесказаного:

Згідно з результатами великої кількості наукових робіт різних авторів встановлено, що:

1. Причиною гострих лейкозів та лімфом є хромосомні мутації в районах локалізації протоонкогенів.
2. Феномени ПРЦ та С-анафаза є явищами не випадковими, вони пов'язані з низкою захворювань, зокрема, з патогенезом онкологічних захворювань.
3. Феномен ПРЦ пов'язаний з утворенням анеуплоїдних, гіперплоїдних, поліплоїдних клонів та ендоредуплікантів.
4. Феномен ПРЦ пов'язаний з онкогенезом гострих лейкозів та лімфом.
5. Зареєстрований паралельний прояв явищ апоптозу і низки цитогенетичних аномалій, що в свою чергу пов'язані з феноменами ПРЦ та С-анафази.
6. Явища як ПРЦ, так і С-анафази не є якимись двома явищами, вони є сукупністю різних феноменів з різними механізмами, що мають однаковий фенотипічний прояв.

20. Власні дослідження

20.1. Обладнання та реактиви

Клінічні показники визначалися на аналізаторі «Coulter», кількість лімфобластів у ПК визначалася мікроскопічно. Діагнози ГЛЛ та ГМЛ були підтверджені в кожному випадку методом фенотипування клітин на проточному цитофлуориметрі «FABScan Backton Dickenson».

Аналізувалися хромосомні препарати, що були отримані з культури периферійної крові та червоного кісткового мозку на середовищі Ігла фірми «Life Technologis» та «Sigma» з додаванням ембріональної сироватки ВРХ, мітогену фітогемаглютинін (ФГА) фірми «Difco» (для ПК, для КМ ФГА не додавався) та L-глутаміну. Більш високі мітотичні індекси культивованих клітин вдавалось отримувати при використанні середовищ фірми «Life Technologis». Використовувались середовища Ігла, RPMI-1640, 199-хепок-модифіковане вищеназваних фірм. Найвищі мітотичні показники були отримані при використанні середовища RPMI-1640 не залежно від походження клітин і типу культури. Ембріональна сироватка великої рогатої худоби (ВРХ) використовувалась фірми «Biomark Ink». L-глутамін використовувався фірми «Sigma». Колхіцин використовувався фірми «Baker Analyzed». Пропідіум йодид використовувався фірми «Sigma». Хромосомні препарати аналізувалися за допомогою мікроскопа фірми «Leitz».

20.2. Методи досліджень

Феномен ПРЦ досліджувався у культурі клітин периферійної крові та червоного кісткового мозку дітей хворих на ГЛЛ, ГМЛ, негоджкінську лімфому, ідіопатичну гіпопластичну анемію та в людей з контрольної групи.



Рис. 20.2.1. Феномен ПРЦ у культурі клітин червоного кісткового мозку хворого на ГЛЛ. Хромосоми, задіяні в ПРЦ, виділені стрілочками.

Клітини культивувалися 48 або 72 год. при 37°C на середовищі Ігла з додатками описаними вище. Для цього в стерильний культуральний посуд об'ємом 10 мл вносилося 0,5 мл периферійної крові, забраної з антикоагулянтном або відповідно 0,3 мл червоного кісткового мозку, отриманого в результаті пункції з грудини. Потім додавалось в

стерильних умовах 6 мл середовища Ігла, 1 мл ембріональної сироватки ВРХ, 0,1 мл насиченого розчину L-глутаміну. Для ФГА-стимульованих культур периферійної крові додавалось 0,1 мл стандартного розчину М-ФГА. При високому бластозі (коли рівень бластів перевищував 30 % від всіх лейкоцитів) об'єм периферійної крові для культури зменшували до 0,3 мл. Саме при таких співвідношеннях речовин і крові в культуральному середовищі спостерігався максимальний мітотичний індекс.



Рис. 20.2.2. Феномен ПРЦ у культурі клітин периферійної крові хворого на ГЛЛ. Хромосоми, задіяні в ПРЦ, показані стрілочками.

Крім 48-годинної культури щодо пацієнтів з високим бластозом, практикували 24-годинні культури клітин як кісткового мозку, так і периферійної крові. У цих випадках не стимульована ФГА культура клітин культивувалась 24 години. Периферійна кров контрольної групи людей, крім 48-годинної культури, культивувалась 72 години – в обох

випадках з мітогеном ФГА. Клітини культивувалися при 37°C в термостаті.

За 2 год. до завершення клітинного циклу додавався колхіцин – 0,1 мл в концентрації 0,01 мг/мл. Після цього клітини центрифугували, додавали гіпотонічного розчину КСІ в концентрації 0,075 М.

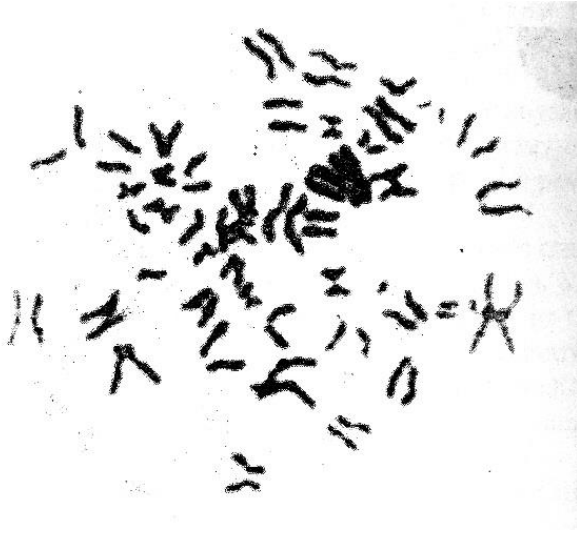


Рис. 20.2.3. Феномен С-анафази в культурі клітин червоного кісткового мозку хворого на ГЛЛ.

Гіпотонія проводилась 30 хв при 37°C в термостаті. Клітини фіксувалися сумішшю етанол : оцтова кислота (оцтова кислота безводна) в пропорціях 3:1 і розкапувалися на предметні скельця. Приготування хромосомних препаратів проводилось стандартно. У цій роботі були використані препарати, які забарвлювалися рутинно барвником Гімза. Крім рутинного забарвлення застосовувалось і диференційне забарвлення хромосом для пошуку хромосомних мутацій та ідентифікації хромосом

при анеупоїдії. Стандартні методики приготування хромосомних препаратів були дещо модифіковані в зв'язку з тим, що бластні клітини в культурі потребують більшої кількості L-глутаміну, інтенсивніше переробляють субстрат і більше виділяють токсичних речовин – продуктів метаболізму.



Рис. 20.2.4. Феномен С-анафази в культурі клітин периферійної крові хворого на ГЛЛ.

Модифікація методики, що описана вище, давала значно більший мітотичний індекс і дозволяла в окремих випадках отримувати понад 100 мітозів клітин периферійної крові не стимульованої ФГА при тотальному бластозі, хоча в літературі зазначається, що при тотальному бластозі мітотичний індекс або вкрай низький,

або хромосомні препарати не вдалось отримувати взагалі [14].

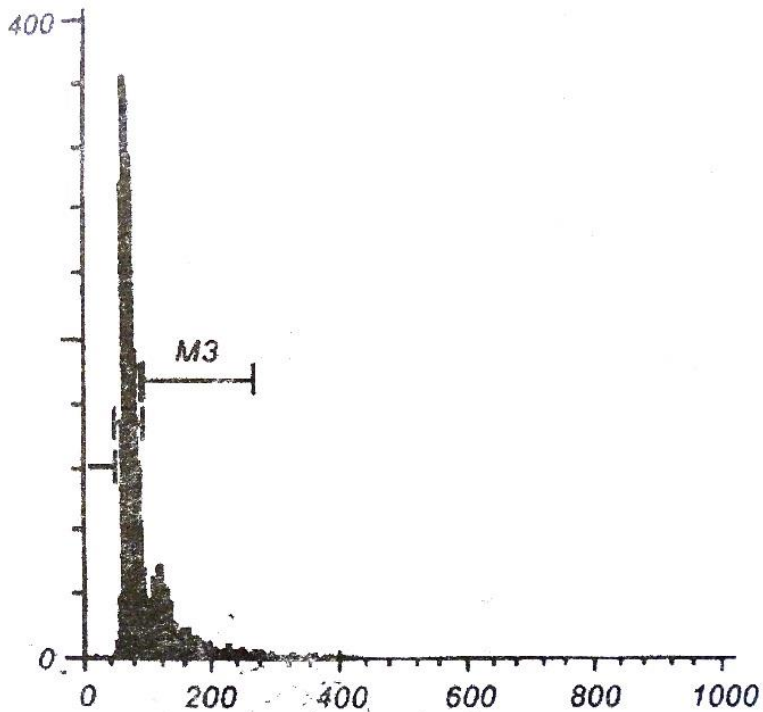


Рис. 20.2.5. Розподіл ДНК у клітинах, що перебувають у різних фазах клітинного циклу (цитофлуориметричний аналіз клітин периферійної крові здорової людини з контрольної групи). Картина відповідає розподілу кількості ДНК на одну клітину відповідно до норми перебігу клітинного циклу: G₀/G₁, S, G₂, M. На діаграмі по горизонталі позначено інтенсивність флуорисценції окремої клітини, а на вертикалі – кількість клітин. Умовні одиниці.

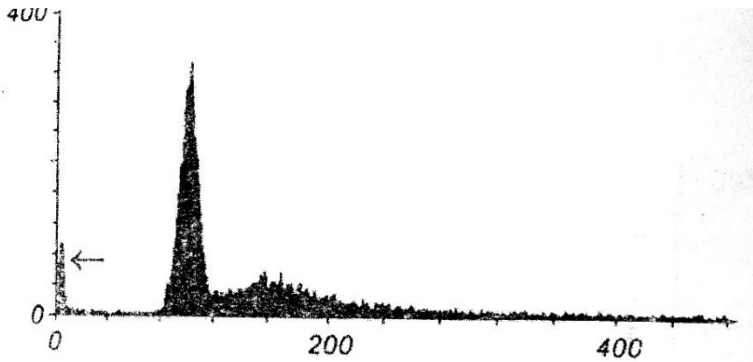


Рис. 20.2.6. Розподіл ДНК в клітинах у різних фазах клітинного циклу (цитофлуориметричний аналіз клітин червоного кісткового мозку хворого на ГЛЛ). Прогресуюча втрата ДНК апоптозними клітинами призводить до утворення додаткового піку (показано стрілкою). Позначення як на рис. 20.2.5.

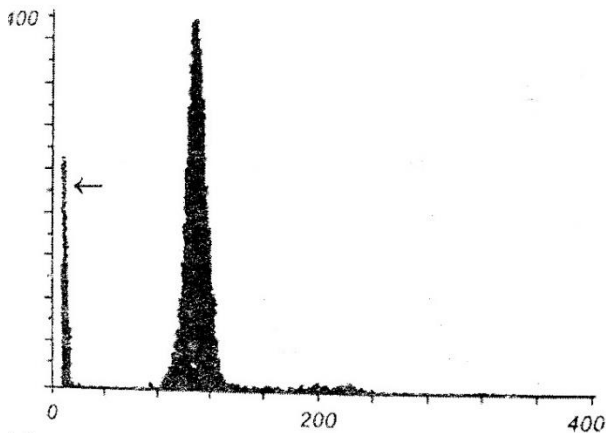


Рис. 20.2.7. Розподіл ДНК в клітинах у різних фазах клітинного циклу (цитофлуориметричний аналіз клітин периферійної крові хворого на ГЛЛ). Прогресуюча втрата ДНК апоптозними клітинами призводить до утворення додаткового піку. Позначення як на рис. 20.2.5.

Синхронізація клітинного циклу проводилась наступним чином: через 2 години після початку культивування клітин в культуру вводились стерильні розчини 5-флор-уридину та уридину (стандартизовані для цієї методики), ще через 18 годин вводився стерильний розчин тимідину (стандартний для цієї методики) і ще через 5 годин 30 хвилин – розчин колхіцину. Далі клітини оброблялися стандартно – як описано вище.

Для дослідження клітинних популяцій, клітинних циклів, вмісту ДНК, рівня апоптозу в клітинах хворих на ГЛЛ, ГМЛ, негоджкінські лімфоми та ідіопатичну гіпопластичну анемію з метою дослідження рівня апоптозу (точніше, для виявлення клітин з прогресуючою втратою ДНК, які умовно можна назвати апоптичними клітинами) клітини обробляли наступним чином: периферійна кров чи червоний кістковий мозок розводились фізрозчином у співвідношенні 1:1 для периферійної крові та в співвідношенні 1:3 для червоного кісткового мозку, нашаровувались на фікол-верографіновий градієнт і центрифугувалися 45 хв. при 1500 об/хв. Потім кільце з виділених клітин промивалось двічі фізрозчином і клітини фіксувались 70% етанолом. Після фіксації клітини центрифугували, висушували від етанолу, ресуспендували в 0,5 мл розчину пропідіум йодиду (200 мк/мл пропідіум йодиду, 0,1% розчин NP-40, 0,9% хлориду натрію), додавалась РНК-аза А (50 мкг/мл). Потім клітини інкубувалися 30 хв. при 4°C. Після цього клітини тричі промивалися в забуференому фізрозчині (PBS) і аналізувались на проточному цитофлуориметрі FACScan з використанням аргонного лазера з довжиною хвиль $\lambda = 488$ нм. Використовувались методики, що описані в [116]. Приклади діаграм, отриманих на проточному цитофлуориметрі наведені на рис. 20.2.5, 20.2.6, 20.2.7.

При дослідженні ПРЦ та С-анафази ми застосували наступний підхід: якщо ПРЦ охоплювало від 1 до 22 хромосом каріотипу, то ми вважали, що маємо справу з феноменом ПРЦ. Якщо феномен охоплював від 23 (50%) до 46 (100%) хромосом, то ми вважали, що маємо справу з феноменом С-анафази. Проте, переважно при ідентифікації явища у нас не виникало подібних проблем. Феномен ПРЦ переважно охоплював 1 – 10 хромосом, а С-анафаза переважно стосувалась 100 % хромосом - всіх хромосом клітини (незалежно від плоідності клітин) (рис. 20.2.1, 20.2.2, 20.2.3, 20.2.4).

20.3. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичний аналіз результатів здійснювався за допомогою програм «Statistica 6.0» та «Excell 2007» з пакету «Microsoft office». Для аналізу результатів дослідження використовували коефіцієнт кореляції, t-критерій Стьюдента – для визначення різниці між векторами середніх при їх сукупному розгляді. При обробці результатів були використані традиційні методи математичної статистики, в тому числі використовувались середні арифметичні (M), похибка середніх арифметичних (m) та критерій Стьюдента за групами. Оцінка відмінностей проводилась з використанням критерію Пірсона.

20.4. Контрольна група

В якості контрольної групи аналізувались здорові діти, що проходили обстеження – у них для визначення біохімічних показників брався аналіз крові – клітини крові були використані для цитогенетичних досліджень.

Контрольну групу склали діти віком від 0 до 14 років, які після обстеження були визнані здоровими.

Загалом, було досліджено 15 здорових дітей, що склали контрольну групу. Загалом, рівень ПРЦ у цій контрольній групі коливався від 0 до 6% клітин і становив в середньому $1,7 \pm 0,3$ %. С-анафаза в контрольній групі не зустрічалася зовсім (0 %). Крім того, було проведено дослідження червоного кісткового мозку 3 здорових дітей – пункція була зроблена в результаті помилкового діагнозу, що був здійснений у районних лікарнях. Хоча вибірка в цьому випадку була малою, але рівень ПРЦ був близький до контрольної групи – становив в середньому $3,0 \pm 0,3$ %, С-анафаза не зустрічалася зовсім (0%). Це наводить на думку про те, що феномени ПРЦ та С-анафази не властиві нормальним здоровим проліферуючим клітинам, а властиві клітинам при певних патологічних процесах. Було ще досліджено червоний кістковий мозок 3 здорових дорослих людей, що були донорами червоного кісткового мозку для трансплантації його пацієнтам з гематологічними патологіями.

Рівень ПРЦ та С-анафази в червоному кістковому мозку не відрізнявся у них від попередньої групи і становив в середньому $3,0 \pm 0,3$ % для ПРЦ і 0% для С-анафази.

20.5. Феномен передчасного розділення метафазних хромосом при гострому лімфобластному лейкозі в дітей

20.5.1. Клінічна характеристика обстежених осіб

Було досліджено периферійну кров та червоний кістковий мозок у 57 хворих на ГЛЛ дітей віком від 0 до 14 років – у цих пацієнтів були отримані хромосомні препарати з високим мітотичним індексом, достатнім для статистичного аналізу (переважно не менше 100 мітозів). Переважна більшість досліджень були здійснені в 1991 – 1999 роках, окремі результати були отримані пізніше – в 1999 – 2019 роках.

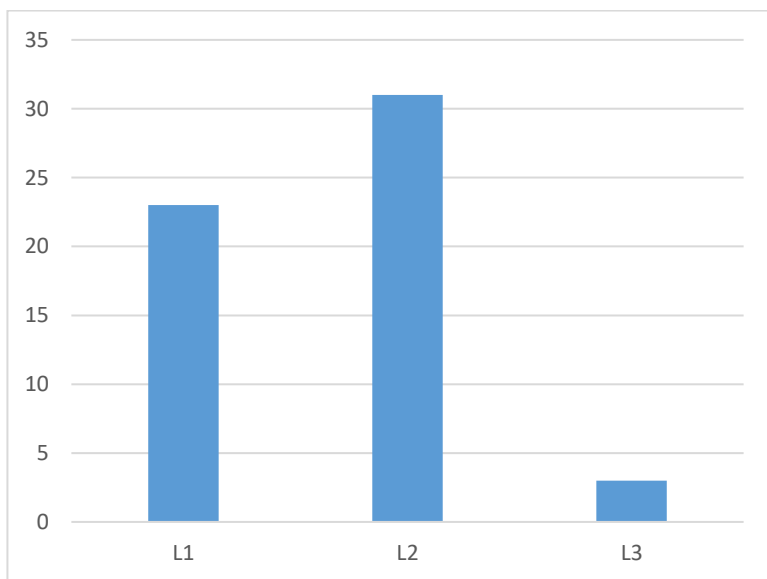


Рис. 20.5.1.2. Кількість досліджених хворих на ГЛЛ дітей різних форм згідно FAB-класифікації.

Більшість пацієнтів, хворих на ГЛЛ дітей, були діти чоловічої статі (33 пацієнти – 57,9 %) (рис. 20.5.1.1). Це відповідає даним інших дослідників про те, що ГЛЛ серед чоловіків трапляється частіше ніж серед жінок.

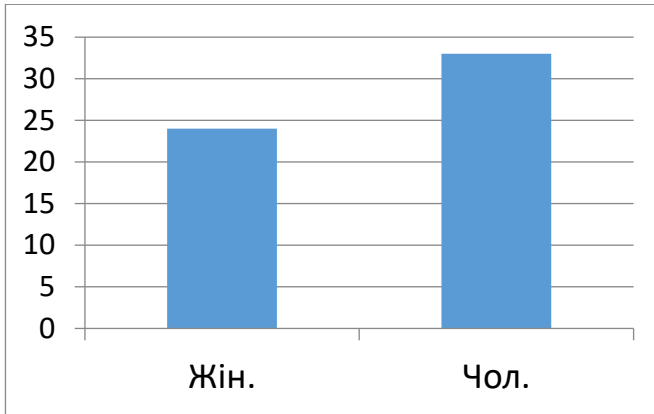


Рис. 20.5.1.1. Число досліджених нами хворих на ГЛЛ дітей різної статі.

По FAB-класифікації досліджені хворі на ГЛЛ пацієнти ділились на наступні групи:

1. L1 – 23 хворих.
2. L2 – 31 хворих.
3. L3 – 3 хворих.

Згідно із імунологічною класифікацією, зробленою з використанням проточної цитофлуориметрії, досліджені пацієнти ділилися на наступні групи з такими формами ГЛЛ:

1. pre-pre-B – 4 пацієнти.
2. pre-B – 44 пацієнти.
3. B – 4 пацієнти.
4. T – 5 пацієнтів.

Якщо поєднати FAB-класифікацію з імунологічною, то серед досліджених пацієнтів було досліджено наступні групи дітей хворих на ГЛЛ:

1. pre-pre-B L1 – 1
2. pre-pre-B L2 – 3
3. pre-B L1 – 20
4. pre-B L2 – 21
5. pre-B L3 – 3
6. B L2 – 4
7. T L1 – 2
8. T L2 – 3

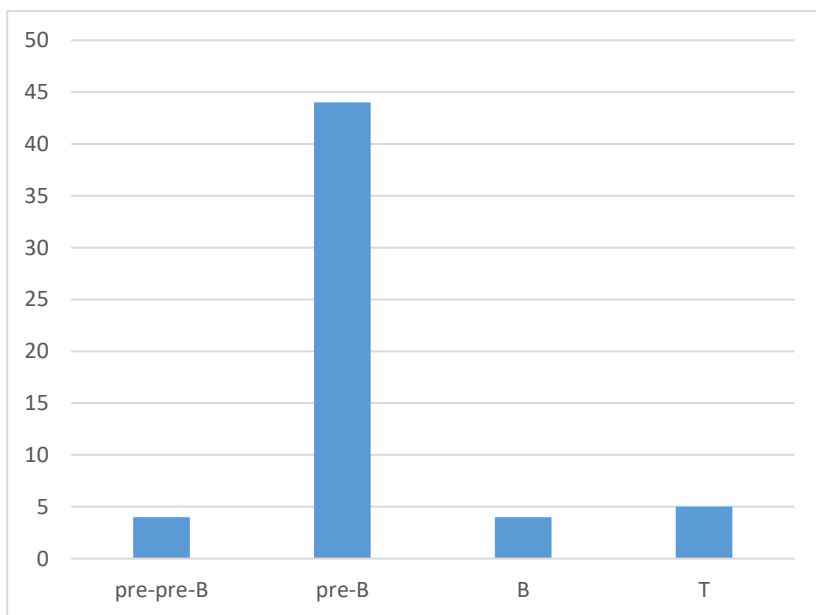


Рис. 20.5.1.3. Співвідношення числа досліджених випадків різних форм ГЛЛ у дітей згідно з імунологічною класифікацією.

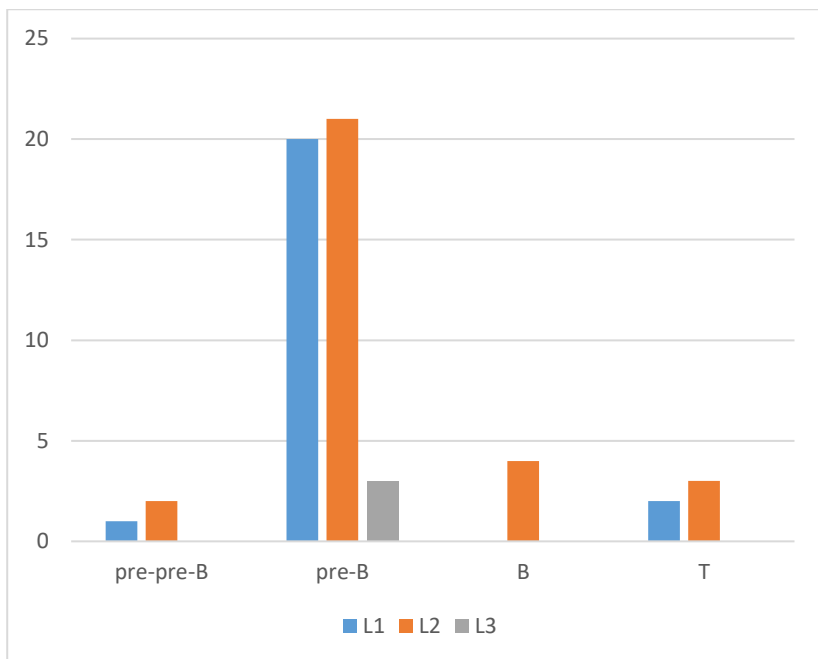


Рис. 20.5.1.4. Співвідношення числа досліджених випадків різних форм ГЛЛ у дітей. Показана кількість виявлених хворих з L1, L2, L3 формами ГЛЛ різних імунологічних груп ГЛЛ.

Досліджувались хворі на ГЛЛ діти на різних стадіях перебігу хвороби, зокрема, були досліджені пацієнти в I гострий період, II гострий період, III гострий період, V гострий період та в період ремісії. Кількість досліджених хворих різних стадій перебігу ГЛЛ наступна:

I гострий період – 57 пацієнтів.

II гострий період – 3 пацієнти.

III гострий період – 1 пацієнт.

V гострий період – 1 пацієнт.

Період ремісії – 20 пацієнтів.

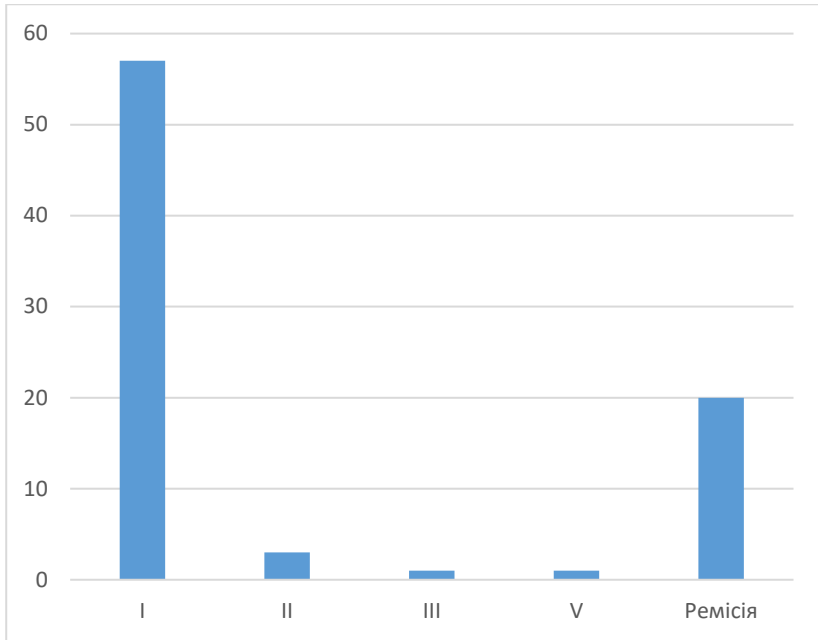


Рис. 20.5.1.5. Кількість досліджених пацієнтів різних стадій перебігу ГЛЛ.

Переважає більшість хворих на ГЛЛ дітей лікувались по протоколу ГЛЛ-ДГЛУ-95, лише 7 досліджених хворих лікувались по протоколу ГЛЛ-ДГЛУ-93, що є різновидністю протоколу ГЛЛ-ДГЛУ-95 і практично від нього не відрізняється.

Досліджені діти – хворі на ГЛЛ належали до наступних вікових груп:

1. Від 0 до 1 року – 2 пацієнти.
2. Від 2 до 4 років – 15 пацієнтів.
3. Від 5 до 7 років – 21 пацієнт.
4. Від 8 до 10 років – 7 пацієнтів.
5. Від 11 до 14 років – 12 пацієнтів.

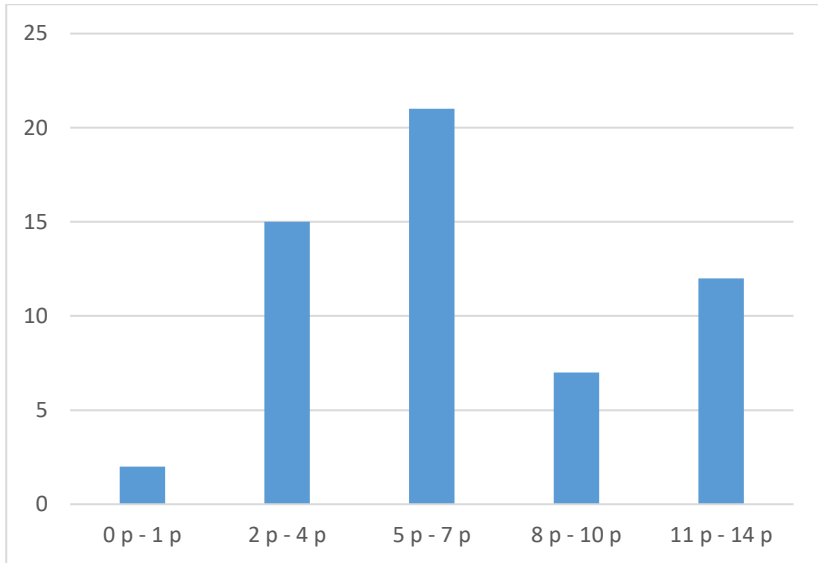


Рис. 20.5.1.6. Розподіл досліджених пацієнтів - хворих на ГЛЛ за віковими групами.

Досліджені пацієнти – хворі на ГЛЛ мали різні рівні бластозу – різні рівні злоякісних лімфобластів в периферійній крові. За рівнем бластозу досліджені пацієнти діляться на наступні групи:

1. 0 % бластів в ПК – 4 пацієнти.
2. 1 – 2 % бластів в ПК – 3 пацієнти.
3. 3 – 10 % бластів в ПК – 12 пацієнтів.
4. 11 – 25 % бластів в ПК – 6 пацієнтів.
5. 26 – 60 % бластів в ПК – 14 пацієнтів.
6. 61 – 99 % бластів в ПК – 15 пацієнтів.
7. 100 % бластів в ПК – 3 пацієнти.

Досліджені пацієнти – хворі на ГЛЛ діти ділились і на групи за рівнем злоякісних бластів в червоному кістковому мозку. Розподіл за цими групами був наступний:

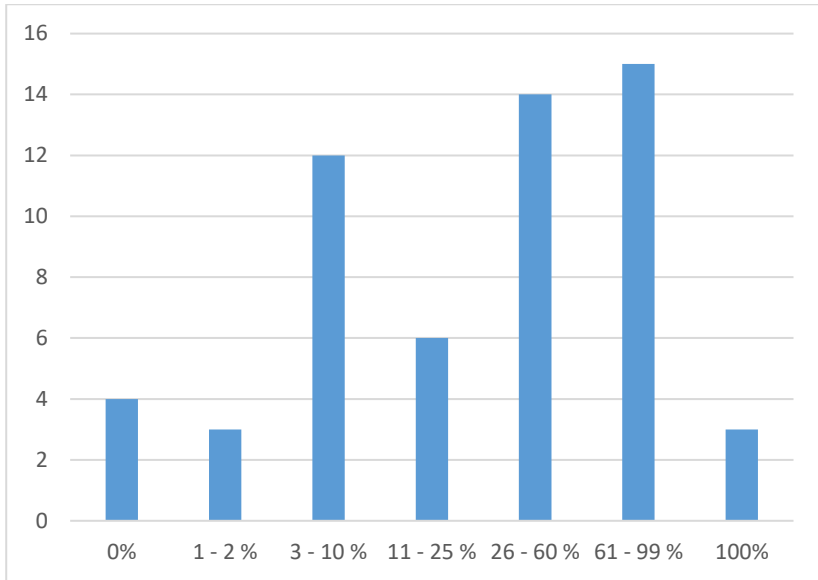


Рис. 20.5.1.7. Розподіл досліджених пацієнтів – хворих на ГЛЛ по групах з різним рівнем бластозу в периферійній крові. Показано рівень бластів в ПК в відсотках.

1. 0 % злоякісних бластів в КМ – 0 пацієнтів.
2. 1 – 10 % злоякісних бластів в КМ – 0 пацієнтів.
3. 11 – 30 % злоякісних бластів в КМ – 0 пацієнтів.
4. 31 – 50 % злоякісних бластів в КМ – 4 пацієнти.
5. 51 – 70 % злоякісних бластів в КМ – 5 пацієнти.
6. 71 – 99 % злоякісних бластів в КМ – 35 пацієнти.
7. 100 % злоякісних бластів в КМ – 13 пацієнтів.

За загальним рівнем лейкоцитів у периферійній крові досліджених хворих на ГЛЛ можна розділити на наступні групи:

1. 0 – 1 тис./мм³ – 1 пацієнт.
2. 2 – 8 тис./мм³ – 12 пацієнтів.

3. 9 – 12 тис./мм³ – 10 пацієнтів.
 4. 13 – 17 тис./мм³ – 7 пацієнтів.
 5. 18 – 25 тис./мм³ – 13 пацієнтів.
 6. 26 – 40 тис./мм³ – 7 пацієнтів.
 7. 41 – 70 тис./мм³ – 1 пацієнт.
 8. 71 – 100 тис./мм³ – 4 пацієнти.
 9. 101 – 200 тис./мм³ – 1 пацієнт
 10. > 200 тис./мм³ – 1 пацієнт.
- (Норма становить 4 – 10 тис./мм³).

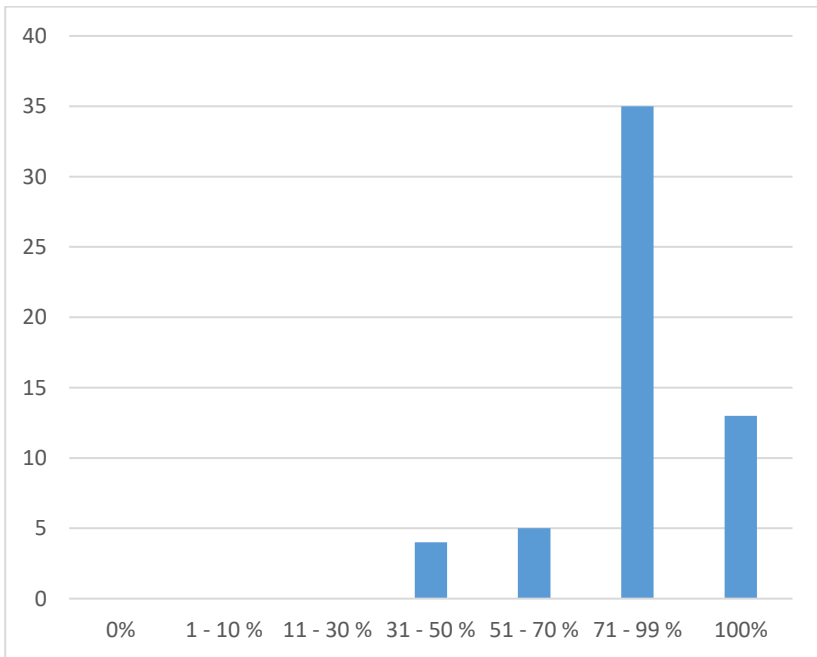


Рис. 20.5.1.8. Розподіл досліджених пацієнтів – хворих на ГЛЛ по групах з різним рівнем злоякісного бластозу в червоному кістковому мозку.

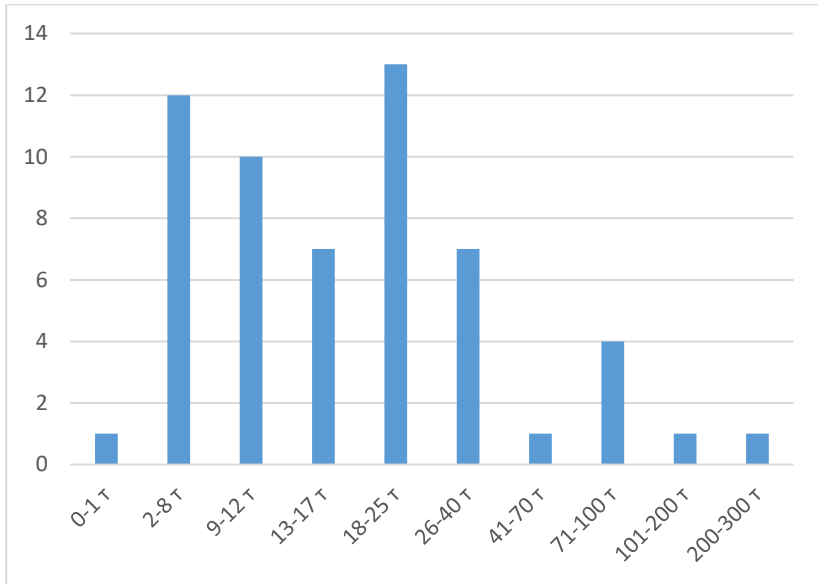


Рис. 20.5.1.9. Розподіл досліджених пацієнтів – хворих на ГЛЛ дітей по групах з різним рівнем лейкоцитів у периферійній крові. Показана кількість пацієнтів і рівень лейкоцитів в тис./мм³.

За рівнем гемоглобіну в периферійній крові досліджених пацієнтів – хворих на ГЛЛ можна розбити на наступні категорії:

1. 30 – 60 г/л – 8 пацієнтів.
 2. 61 – 80 г/л – 21 пацієнт.
 3. 81 – 100 г/л – 21 пацієнт
 4. 101 – 120 г/л – 5 пацієнтів.
 5. 121 – 130 г/л – 2 пацієнти.
- (Норма становить 114 – 140 г/л).

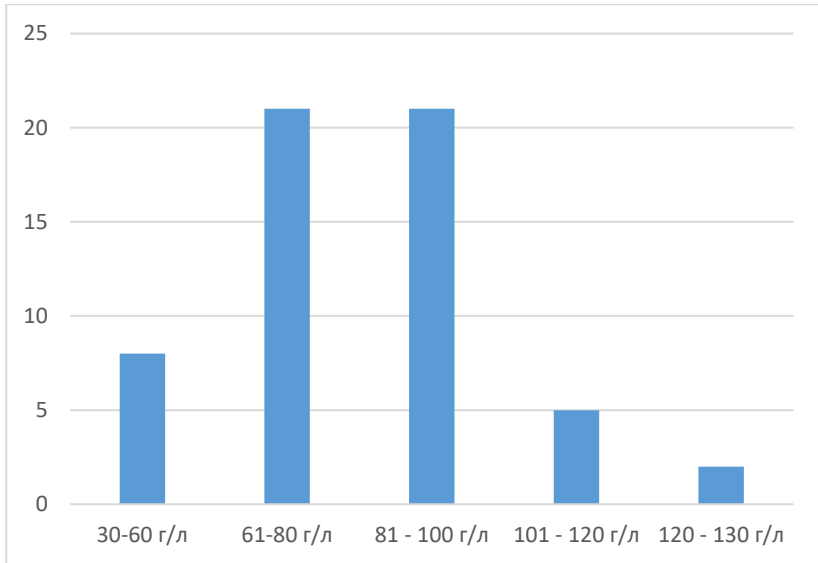


Рис. 20.5.1.10. Розподіл досліджених пацієнтів – хворих на ГЛЛ дітей по групах з різним рівнем гемоглобіну в периферійній крові.

За рівнем тромбоцитів у досліджених пацієнтів – хворих на ГЛЛ дітей можна розбити на наступні групи:

1. 0 – 20 тис./мм³ – 6 пацієнтів.
2. 21 – 50 тис./мм³ – 15 пацієнтів.
3. 51 – 80 тис./мм³ – 11 пацієнтів.
4. 81 – 100 тис./мм³ – 5 пацієнти.
5. 101 – 150 тис./мм³ – 9 пацієнтів.
6. 150 – 200 тис./мм³ – 6 пацієнтів.
7. > 200 тис./мм³ – 5 пацієнтів.

(Примітка: норма становить: 180 – 450 тис./мм³).

Відносно гепатомегалії, то досліджені діти – хворі на ГЛЛ в I гострому періоді до початку лікування діляться на наступні групи:

1. Гепатомегалія відсутня – 9 пацієнтів.
2. Гепатомегалія 0–2 см нижче реберної дуги (н.р.д.) – 17 пацієнтів.
3. Гепатомегалія 3-4 см н.р.д. – 19 пацієнтів.
4. Гепатомегалія 5-6 см н.р.д. – 7 пацієнтів.
5. Гепатомегалія 7-9 см н.р.д. – 3 пацієнти.
6. Гепатомегалія > 9 см – 2 пацієнти.

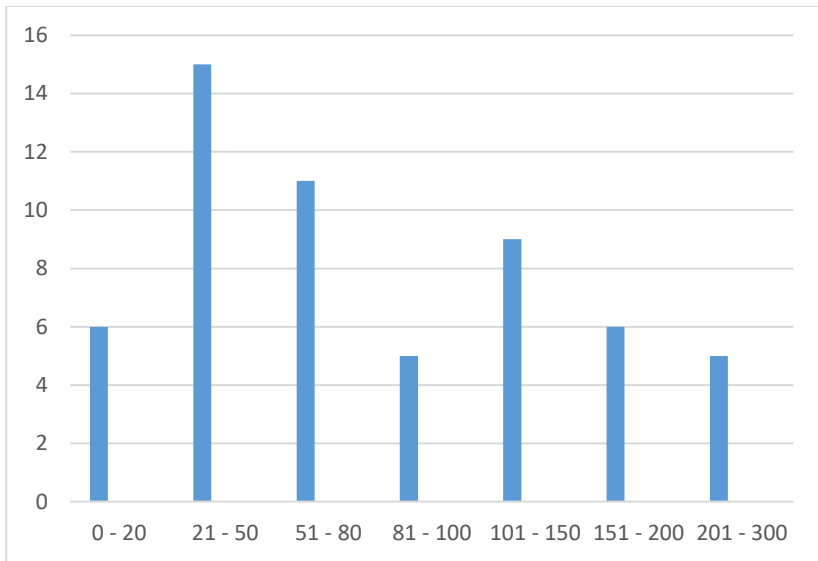


Рис. 20.5.1.10. Розподіл досліджених пацієнтів – хворих на ГЛЛ дітей по групах з різним рівнем тромбоцитів в периферійній крові. Показана кількість пацієнтів та рівень тромбоцитів в тис./мм³

Відносно спленомегалії, то досліджені хворі на ГЛЛ діти в I гострому періоді ділилися на наступні групи:

1. Спленомегалія відсутня – 18 пацієнтів.
2. Спленомегалія 0–1 см нижче реберної дуги – 17 пацієнтів.

3. Спленомегалія 1-2 см н.р.д. – 8 пацієнтів.
4. Спленомегалія 2-3 см н.р.д. – 1 пацієнт.
5. Спленомегалія 3-5 см н.р.д. – 5 пацієнтів.
6. Спленомегалія 5-7 см н.р.д. – 2 пацієнти.
7. Спленомегалія > 7 см. – 6 пацієнтів.

(Примітка: дані наведені від... до...від – включно, до – не включно).

Відносно збільшення лімфовузлів досліджених хворих на ГЛЛ дітей в I гострий період можна розділити на наступні категорії:

1. Лімфовузли не збільшені – 10 пацієнтів.
2. Збільшені шийні лімфовузли – 16 пацієнтів.
3. Збільшені пахові лімфовузли – 18 пацієнтів.
4. Збільшені аксилярні лімфовузли – 12 пацієнтів.
5. Збільшені підщелепові лімфовузли – 3 пацієнти.
6. Збільшені абдомінальні лімфовузли – 1 пацієнд.

Всі хворі на ГЛЛ, яким було здійснено успішне каріотипування з отриманням препаратів з високим мітотичним індексом в I гострому періоді до початку лікування не отримували хіміотерапії, за винятком 1 пацієнта, що за 6 місяців до проведення аналізів отримав незначні ін'єкції преднізолону.

Всі хворі на стадії ремісії, яким було здійснене успішне каріотипування з високим мітотичним індексом, перебували на стадії повної ремісії мінімум 1 рік, рівень бластів в червоному кістковому мозку складав 0 – 2 %. Лише 1 хворий з досліджених перебував, як пізніше виявилось, у неповній ремісії.

Всі досліджені хворі на ГЛЛ діти не мали попередніх злоякісних онкологічних захворювань та гематологічних захворювань. У всіх досліджених хворих на ГЛЛ дітей до початку лікування не було цитостатичної терапії. Тих

хворих на ГЛЛ дітей, які мали цитостатичну терапію до забору аналізів, не вдалося каріотипувати – жодної мітотичної пластини отримати не вдалося.

Всі хворі на ГЛЛ з рецедивами захворювання пройшли курс хіміотерапії згідно із відповідним протоколом.

З 57 досліджених в I гострому періоді пацієнтів з ГЛЛ (каріотипування яких було здійснено успішно і отримані результати щодо ПРЦ та С-анафази):

- 36 (63,2 %) – досягли тривалої стадії ремісії;
- 11 (19,2 %) – померли, не дійшовши до стадії ремісії;
- 10 (17,6 %) – мали швидкий рецидив (або рецидиви) і померли внаслідок цього.

З 36 пацієнтів, що досягли тривалої ремісії, 2 померли внаслідок причин, що не пов'язані з перебігом основного захворювання. Основним критерієм тривалої ремісії вважалось наявність в червоному кістковому мозку рівня бластів, що не перевищував 2 %.

20.5.2. Зв'язок феномену передчасного розділення центромер метафазних хромосом з патогенезом і перебігом гострого лімфобластного лейкозу

У лабораторії Львівської обласної дитячої спеціалізованої клінічної лікарні (ЛОДСКЛ) було проведено цитогенетичні дослідження 191 хворої на ГЛЛ дитини віком від 0 до 14 років включно. Проте якісні хромосомні препарати з високим мітотичним індексом (більше 100 мітозів), достатнім для дослідження ПРЦ, вдалося отримати тільки в 57 пацієнтів. Представлені нижче результати досліджень отримані переважно в 1991 – 1999 роках включно з деяким доповненням результатів досліджень, отриманих в 2000 – 2019 роках. Враховуючи

важкий стан пацієнтів, що поступали на лікування, такий вихід результативності ми вважаємо високим. Лише невелика частина пацієнтів (менше 15 %) поступала на лікування на ранніх стадіях перебігу ГЛЛ. У різних лабораторіях світу, щодо аналогічних хворих, результативність в той час складала біля 30 %, при цьому дуже часто отримували препарати з дуже низьким мітотичним індексом, що робило неможливим дослідження ПРЦ і статистичний аналіз. Це пояснюється низькою причиною: низькою здатністю лімфобластів переходити в культуру *in vitro* і ділитися в культурі, нечутливістю клітин до ФГА, посиленням метаболізмом злякисного клону (внаслідок чого настає швидка інтоксикація продуктами метаболізму клітин в культурі), посилене споживання лімфобластами різних речовин (зокрема, глютаміну). Вищеописана методика, розроблена і застосована нами, була більш результативною, але не усунула всіх перешкод для отримання якісних хромосомних препаратів від хворих на ГЛЛ.

Багато пацієнтів, клітини яких не дали росту в культурі, знаходились в передлетальному стані і померли через короткий час після забору клітин, цілком можливо, що відсутність росту в культурі була зумовлена загальним станом організму.

Результати цитогенетичних досліджень з визначенням рівнів ПРЦ та С-анафази 57 хворих на ГЛЛ дітей в перший гострий період перебігу захворювання наведені в таблиці 20.5.2.1. У цій таблиці наведено форму ГЛЛ, рівень бластів в ПК, результати визначення ПРЦ та С-анафази як в периферійній крові, так і в червоному кістковому мозку. Результати клінічних досліджень цих же пацієнтів наведені в таблиці 20.5.2.2, де показані рівні лейкоцитів, гемоглобіну, тромбоцитів.

Метою цієї роботи не був пошук хромосомних мутацій, що спричиняють онкогенез ГЛЛ, проте, такі дослідження нами проводились і було виявлено низку хромосомних мутацій в культурі клітин хворих на ГЛЛ.

Таблиця 20.5.2.1. Результати цитогенетичних досліджень хворих на ГЛЛ - перший гострий період, периферійна кров, кістковий мозок. Показані умовні позначення пацієнтів, форма ГЛЛ, рівень бластів в ПК, рівні ПРЦ та С-анафази в периферійній крові та кістковому мозку.

№ з/п	Хворий, стать	Форма ГЛЛ		Бласти в ПК (%)	ПРЦ (%)		С-анафаза (%)	
		Імун.	FAV		ПК	КМ	ПК	КМ
1	БС ♂	pre-pre-B	L2	60	29	31	0	1
2	МЛ ♀	T	L2	41	22	25	1	1
3	НВ ♂	pre-B	L1	12	19	21	2	3
4	ЧО ♀	pre-B	L1	10	13	15	5	8
5	ГВ ♂	pre-B	L2	16	15	17	8	9
6	КЛ ♀	B	L2	7	4	5	1	2
7	ЗВ ♂	pre-B	L1	25	19	22	2	3
8	ШС ♂	pre-B	L2	93	53	64	11	15
9	ПМ ♀	pre-B	L1	4	9	10	1	1
10	ХМ ♀	pre-B	L2	0	3	4	0	1
11	КК ♂	pre-B	L1	62	35	39	2	5
12	МК ♀	pre-B	L1	45	33	36	1	3
13	АП ♂	B	L2	43	30	38	8	9
14	СО ♀	pre-B	L2	6	3	4	1	2
15	СН ♀	pre-B	L2	10	41	45	0	1
16	НЮ ♂	pre-B	L1	18	17	19	1	1
17	СС ♀	pre-B	L1	64	36	38	20	25
18	ГХ ♀	pre-B	L2	79	39	41	24	29
19	ІР ♂	pre-B	L1	30	15	17	9	10
20	ГЛ ♀	T	L1	38	18	19	7	9
21	ХА ♂	pre-B	L2	29	16	17	2	3
22	БВ ♂	pre-B	L2	92	45	52	5	9

23	ВО ♂	pre-B	L2	5	3	4	0	0
24	ММ ♀	pre-B	L1	4	2	3	0	1
25	ДА ♂	pre-B	L2	20	31	35	3	5
26	ФО ♂	pre-B	L1	50	25	27	5	7
27	ГР ♂	pre-B	L2	0	2	3	0	0
28	КО ♂	pre-B	L2	10	7	9	1	1
29	ТБ ♂	pre-B	L1	78	40	43	5	8
30	КТ ♀	pre-pre-B	L2	47	21	24	3	5
31	ЧР ♂	pre-B	L2	44	24	25	1	1
32	КЕ ♂	pre-B	L2	15	8	9	0	0
33	ЛУ ♀	pre-B	L2	100	75	89	13	11
34	ПО ♀	pre-B	L2	9	12	15	36	39
35	КМ ♂	pre-B	L2	43	53	61	7	8
36	ЧМ ♂	B	L2	2	3	8	36	43
37	СТ ♂	pre-B	L1	2	4	7	1	1
38	БЛ ♀	pre-B	L1	78	59	54	41	46
39	КН ♀	pre-B	L1	73	51	54	11	12
40	СН ♀	pre-B	L2	23	11	13	2	5
41	ЗМ ♂	pre-B	L2	35	17	19	3	7
42	СО ♂	pre-pre-B	L2	0	2	3	51	55
43	ШМ ♀	pre-B	L1	3	5	7	3	6
44	ЛЛ ♀	pre-B	L1	70	35	37	7	9
45	РД ♂	T	L2	6	11	12	4	10
46	ПР ♀	pre-pre-B	L1	0	4	5	2	1
47	РГ ♀	pre-B	L2	3	2	3	3	4
48	ІС ♀	B	L2	100	78	84	11	12
49	ГГ ♂	T	L2	100	81	85	10	13
50	ЛО ♂	T	L1	65	39	41	7	9
51	БХ ♀	pre-B	L3	74	75	71	15	20
52	БА ♂	pre-B	L1	81	95	93	5	7
53	ПЮ ♂	pre-B	L3	52	23	25	29	31
54	ДА ♂	pre-B	L2	1	1	2	0	0
55	ТТ ♂	pre-B	L3	95	91	95	2	3
56	ГА ♂	pre-B	L1	81	77	79	4	5
57	БЗ ♀	pre-B	L1	90	81	84	5	9
Сep.				39,35	29,16	31,70	7,63	9,58
Std. Err.				± 4,45	± 3,48	± 3,59	± 1,5	± 1,6

Таблиця 20.5.2.2. Результати клінічних досліджень хворих на ГЛЛ - перший гострий період. Показані умовні позначення пацієнтів, форма ГЛЛ, рівень бластів в ПК, рівні гемоглобіну (Hb), лейкоцитів (Leu) та тромбоцитів (Tr).

№ з/п	Хворий, стать	Форма ГЛЛ		Бласти в ПК (%)	Hb (г/л)	Leu (тис./м ³)	Tr (тис./м ³)
		Імун.	FAB				
1	БС ♂	pre-pre-B	L2	60	73	35	25
2	МЛ ♀	T	L2	41	80	22	49
3	НВ ♂	pre-B	L1	12	88	15	89
4	ЧО ♀	pre-B	L1	10	90	11	93
5	ГВ ♂	pre-B	L2	16	74	19	90
6	КЛ ♀	B	L2	7	95	10	149
7	ЗВ ♂	pre-B	L1	25	90	12	59
8	ШС ♂	pre-B	L2	93	74	39	55
9	ПМ ♀	pre-B	L1	4	95	7	142
10	ХМ ♀	pre-B	L2	0	56	5	130
11	КК ♂	pre-B	L1	62	35	49	22
12	МК ♀	pre-B	L1	45	42	20	44
13	АП ♂	B	L2	43	30	19	40
14	СО ♀	pre-B	L2	6	59	15	137
15	СН ♀	pre-B	L2	10	79	13	98
16	НЮ ♂	pre-B	L1	18	83	10	87
17	СС ♀	pre-B	L1	64	58	32	29
18	ГХ ♀	pre-B	L2	79	51	25	21
19	ІР ♂	pre-B	L1	30	79	17	77
20	ГЛ ♀	T	L1	38	48	16	78
21	ХА ♂	pre-B	L2	29	88	10	69
22	БВ ♂	pre-B	L2	92	70	33	23
23	ВО ♂	pre-B	L2	5	104	5	125
24	ММ ♀	pre-B	L1	4	122	12	133
25	ДА ♂	pre-B	L2	20	87	13	73
26	ФО ♂	pre-B	L1	50	80	19	65
27	ГР ♂	pre-B	L2	0	101	8	102
28	КО ♂	pre-B	L2	10	86	7	112
29	ТБ ♂	pre-B	L1	78	63	34	34
30	КТ ♀	pre-pre-B	L2	47	71	20	61
31	ЧР ♂	pre-B	L2	44	72	19	57
32	КЕ ♂	pre-B	L2	15	125	15	60
33	ЛУ ♀	pre-B	L2	100	67	35	24

34	ПО ♀	pre-B	L2	9	89	11	147
35	КМ ♂	pre-B	L2	43	75	12	155
36	ЧМ ♂	B	L2	2	103	8	179
37	СТ ♂	pre-B	L1	2	100	8	188
38	БЛ ♀	pre-B	L1	78	66	25	36
39	КН ♀	pre-B	L1	73	71	20	19
40	СН ♀	pre-B	L2	23	89	11	78
41	ЗМ ♂	pre-B	L2	35	90	10	164
42	СО ♂	pre-pre-B	L2	0	86	5	159
43	ШМ ♀	pre-B	L1	3	91	8	243
44	ЛЛ ♀	pre-B	L1	70	86	82	13
45	РД ♂	T	L2	6	81	5	240
46	ПР ♀	pre-pre-B	L1	0	102	7	47
47	РГ ♀	pre-B	L2	3	98	6	259
48	ІС ♀	B	L2	100	76	99	19
49	ГГ ♂	T	L2	100	71	92	15
50	ЛО ♂	T	L1	65	81	23	215
51	БХ ♀	pre-B	L3	74	70	31	35
52	БА ♂	pre-B	L1	81	69	210	22
53	ПЮ ♂	pre-B	L3	52	70	21	43
54	ДА ♂	pre-B	L2	1	104	1	190
55	ТТ ♂	pre-B	L3	95	65	92	18
56	ГА ♂	pre-B	L1	81	82	20	210
57	БЗ ♀	pre-B	L1	90	91	122	17
Сеп.				39,35	79,32	27,19	90,58
Std. Err.				± 4,45	± 2,48	± 4,68	± 8,90

Хромосомні мутації, виявлені у досліджених хворих на ГЛЛ дітей в перший гострий період:

- t(9;14)
- t(9;22)ph⁺
- der3
- der2p
- der22
- Ydup q⁺
- 21s⁺
- 138XXXXXXXX
- inv9
- 13s⁺

- 69XXX
- 45XY, – C
- 51 XY, +3C, +D, +E
- 92XXYY
- 47XY, +E
- 44XY, - 2C
- 69XXY
- 40XY, - 6C
- 43XY, - C, - 2E
- 45 XY, - A
- 28 XY,
- 43XY, - 3C
- 36XY, - 5C, - 5E
- 44XY, - 2C
- 42XY, - 2C, - 2E
- 38 XY, - 6C, - 2E

Далеко не всі з цих виявлених аномалій були первинними мутаціями – причиною початку патогенезу ГЛЛ, більшість були вторинними, але всі були причинами виникнення аномальних клонів клітин і всі є свідченням нестабільності геному досліджених хворих на ГЛЛ.

Комплексний цитогенетичний аналіз хворих на ГЛЛ дітей на різних стадіях перебігу захворювання (у перший гострий період, на стадії ремісії, під час рецидиву, в контрольній групі) показав, що феномени ПРЦ та С-анафази зустрічаються з високою частотою як в кістковому мозку, так і в периферійній крові хворих на ГЛЛ в перший гострий період – рівень цих феноменів статистично достовірно відрізняється від показників контрольної групи та від показників хворих на ГЛЛ в період ремісії (таблиця 20.5.2.3, рис. 20.5.2.1). У хворих на ГЛЛ – нелікованих, в першому гострому періоді рівень ПРЦ коливався від 2 до 95 % і становив в середньому для червоного кісткового

мозку $31,7 \pm 3,59$, для клітин периферійної крові $29,16 \pm 3,48$. Це статистично достовірно відрізняється від аналогічних показників як контрольної групи, так і групи хворих на ГЛЛ в ремісії ($p < 0,01$).

Таблиця 20.5.2.3. Середні значення рівнів ПРЦ та С-анафази у хворих на ГЛЛ в перший гострий період, в період ремісії та в контрольній групі.

Група	ПРЦ		С-анафаза	
	ПК	КМ	ПК	КМ
ГЛЛ I гострий період	$29,16 \pm 3,48$	$31,70 \pm 3,59$	$7,63 \pm 1,5$	$9,58 \pm 1,5$
ГЛЛ ремісія	$3,4 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,3$	0
Контрольна група	$1,7 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	0	0

Рівень С-анафази в периферійній крові у хворих на ГЛЛ дітей в першому гострому періоді коливався від 0 до 55 % і становив в середньому: для червоного кісткового мозку $9,58 \pm 1,5$ %; для периферійної крові $7,63 \pm 1,5$ %. Це статистично достовірно відрізняється від аналогічних показників як контрольної групи, так і групи хворих на ГЛЛ в ремісії ($p < 0,01$). У контрольній групі С-анафаза не зустрічалася зовсім – ні в червоному кістковому мозку, ні в периферійній крові. У хворих на ГЛЛ в період ремісії в червоному кістковому мозку С-анафаза не зустрічалася зовсім, в периферійній крові поодинокі – в середньому на рівні $1,5 \pm 0,3$ %. Це більш ніж вдвічі відрізняється від рівнів С-анафази в першому гострому періоді.

Було досліджено 20 хворих на ГЛЛ дітей в період ремісії. Час перебування в ремісії у них становив від 3 місяців до 5 років. За основний критерій ремісії брався рівень бластів у червоному кістковому мозку після завершення лікування, що не перевищував 2 %.

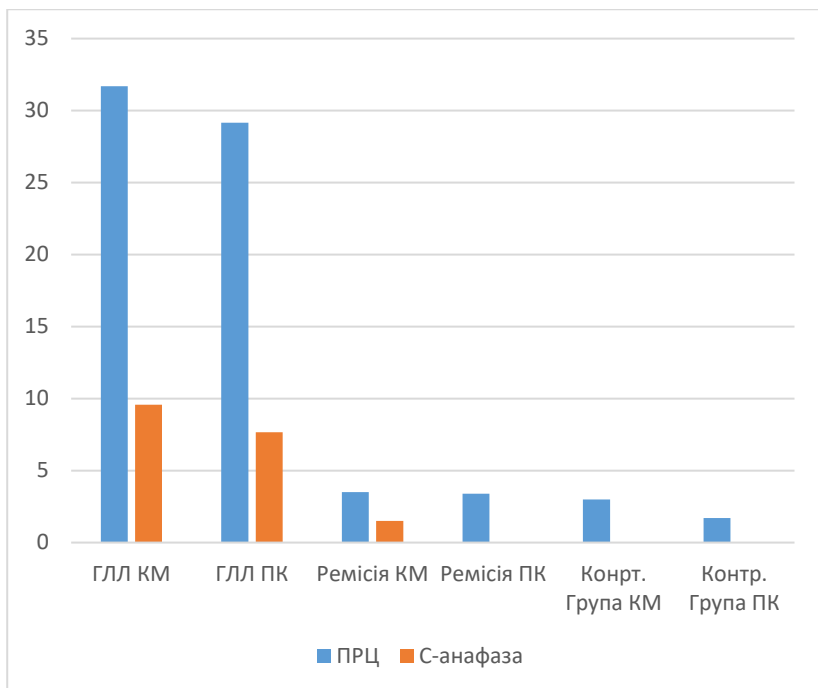


Рис. 20.5.2.1. Середні значення рівнів ПРЦ та С-анафази у хворих на ГЛЛ в першій гострій період, в період ремісії та в контрольній групі.

У період ремісії рівні ПРЦ та С-анафази як у кістковому мозку, так і в периферійній крові статистично достовірно знижувались і статистично достовірно не відрізнялися від контрольної групи. У червоному кістковому мозку в дітей хворих на ГЛЛ в період ремісії рівень ПРЦ становив в середньому $3,5 \pm 0,4$ %, рівень С-анафази становив 0 %. У периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей в період ремісії рівень ПРЦ становив $3,4 \pm 0,3$ %, а рівень С-анафази $1,5 \pm 0,3$ %.

Всі ці отримані результати дозволяють пропонувати ПРЦ та С-анафазу як додаткові діагностичні маркери ГЛЛ, як додаткові критерії ремісії ГЛЛ.

Результати дослідження клінічних показників у хворих на ГЛЛ на різних стадіях перебігу захворювання та в контрольній групі наведені в табл. 20.5.2.4.

Табл. 20.5.2.4. Середні клінічні показники досліджених хворих на ГЛЛ дітей в перший гострий період, в період ремісії та в контрольній групі. Позначення як в табл. 20.5.2.2.

Група	Hb (г/л)	Leu (тис./м ³)	Tg (тис./м ³)
ГЛЛ I гострий період	79,32 ± 2,48	27,19 ± 4,68	90,58 ± 8,90
ГЛЛ ремісія	90,43 ± 3,78	3,25 ± 0,51	180,44 ± 7,43
Контрольна група	134,27 ± 4,03	5,03 ± 1,45	320,76 ± 9,11

Було здійснено чисельні кореляційні дослідження зв'язку феноменів ПРЦ з різними клінічними показниками хворих на ГЛЛ дітей в першому гострому періоді. Результати кореляційного аналізу наведені на рисунках нижче. Як бачимо, наявна висока кореляція між рівнем бластів в периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей та рівнями ПРЦ в клітинах периферійної крові та червоного кісткового мозку. Для периферійної крові цей показник кореляції складає $r = 0,890$; для червоного кісткового мозку коефіцієнт кореляції складає $r = 0,896$. Все це дозволяє припустити, що феномен ПРЦ у хворих на ГЛЛ притаманний в більшій мірі злоякісним бластним клітинам, аніж нормальним лімфоцитам периферійної крові і нормальним клітинам червоного кісткового мозку.

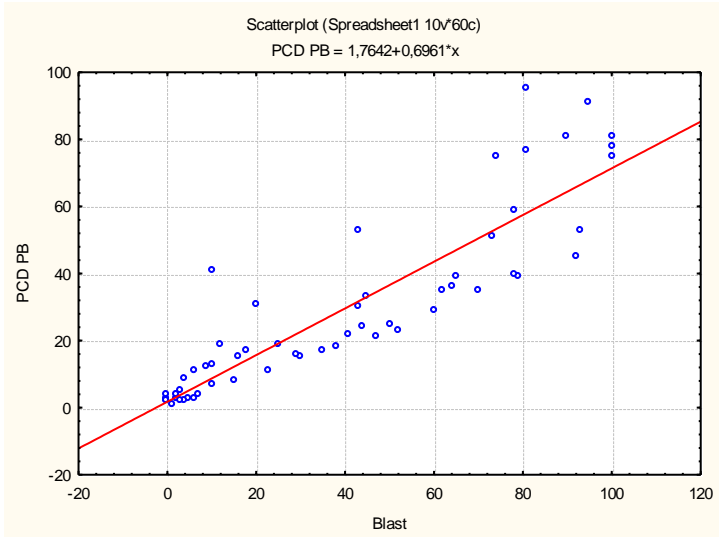


Рис. 20.5.2.2. Лінійна кореляція між рівнем бластів у периферійній крові та рівнем ПРЦ у периферійній крові хворих на ГЛЛ ($r = 0,890$).

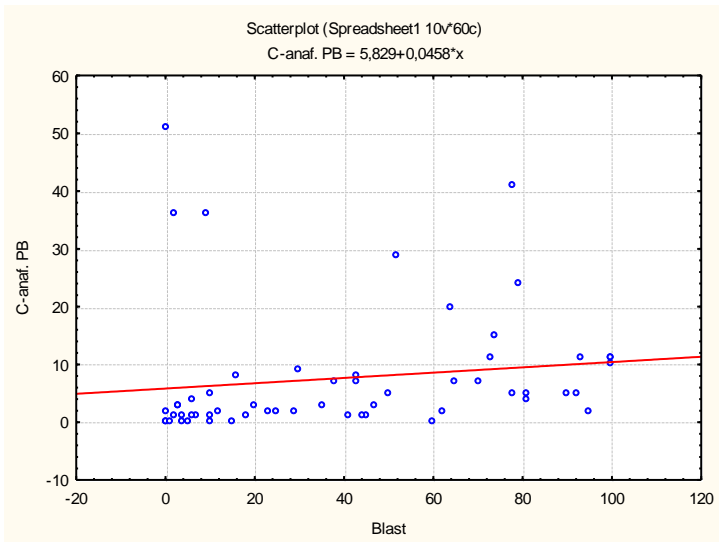


Рис. 20.5.2.3. Зв'язок між рівнем бластів у периферійній крові та рівнем С-анафази у периферійній крові хворих на ГЛЛ ($r = 0,139$) – кореляція відсутня.

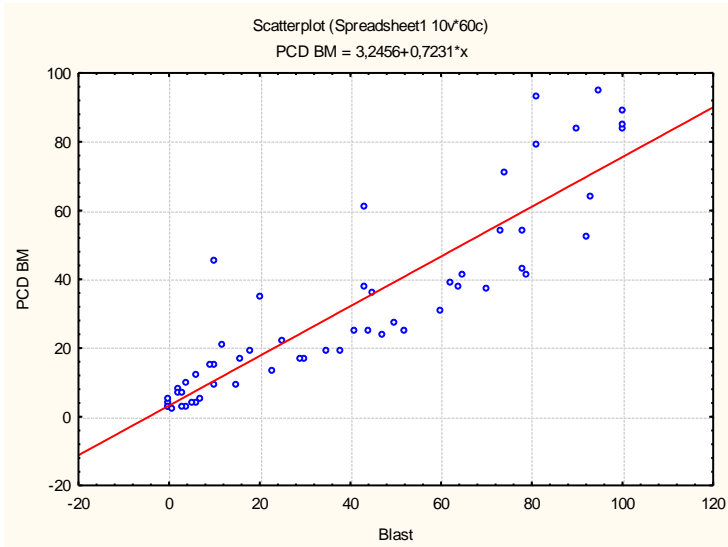


Рис. 20.5.2.4. Лінійна кореляція між рівнем бластів у периферійній крові та рівнем ПРЦ у кістковому мозку хворих на ГЛЛ ($r = 0,896$).

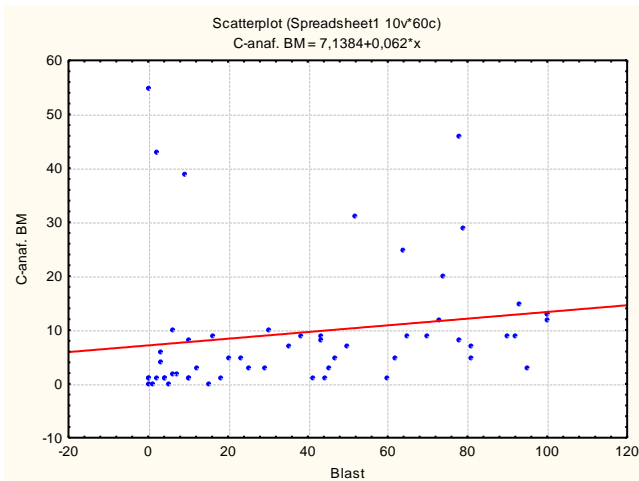


Рис. 20.5.2.5. Зв'язок між рівнем бластів у периферійній крові та рівнем С-анафазу у кістковому мозку хворих на ГМЛ ($r = 0,171$) – кореляція відсутня.

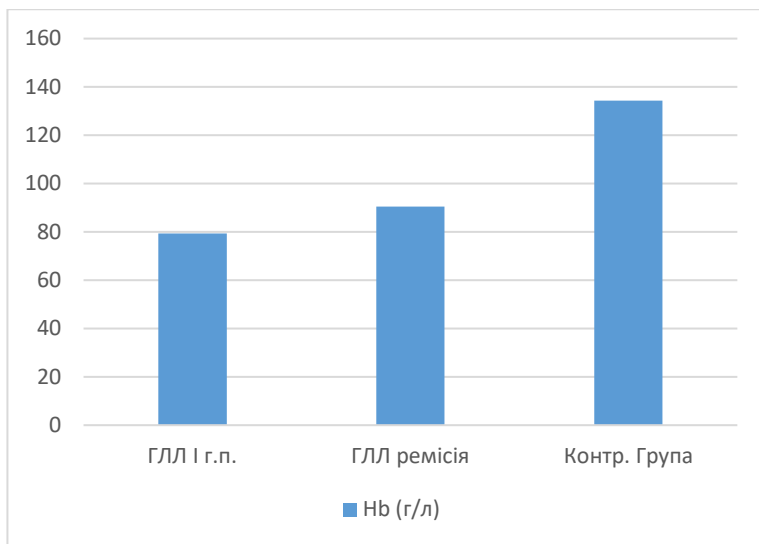


Рис. 20.5.2.6. Середні рівні гемоглобіну в досліджених хворих на ГЛЛ в I гострий період, в період ремісії та в контрольній групі.

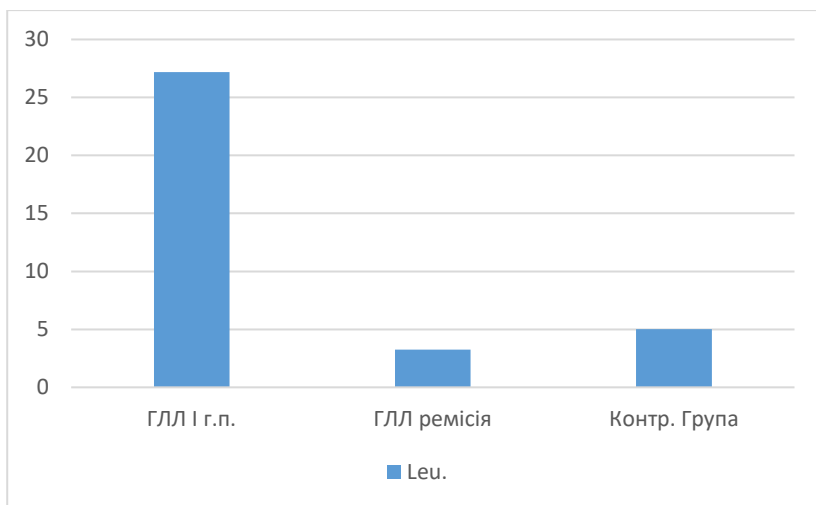


Рис. 20.5.2.7. Середні рівні лейкоцитів у досліджених хворих на ГЛЛ в I гострий період, в період ремісії та в контрольній групі в тис./м³.

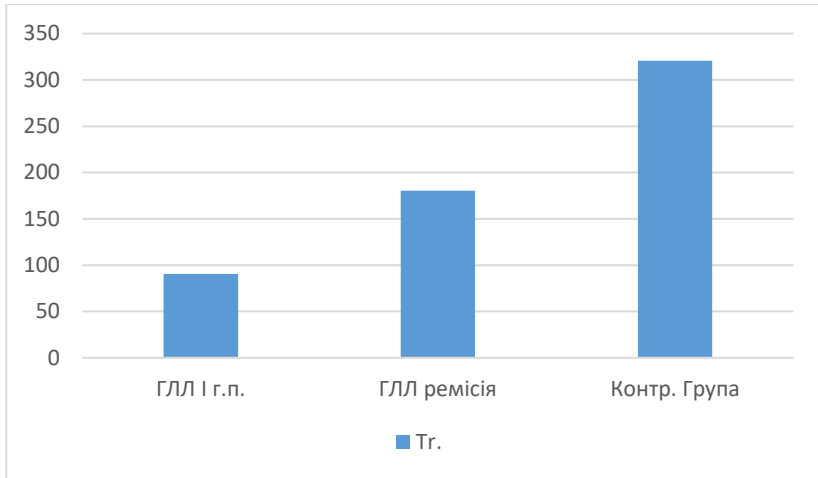


Рис. 20.5.2.6. Середні рівні тромбоцитів у досліджених хворих на ГЛЛ в I гострий період, в період ремісії та в контрольній групі в тис./м³.

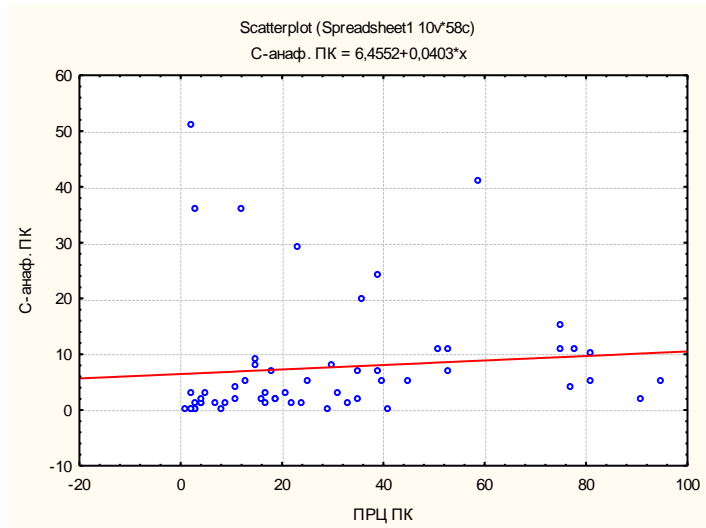


Рис. 20.5.2.7. Зв'язок між феноменами ПРЦ та С-анафазі в периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей в перший гострий період. Кореляція відсутня ($r = 0,096$).

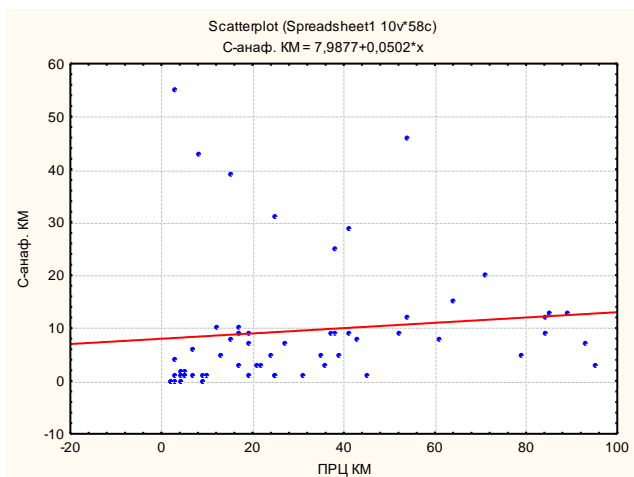


Рис. 20.5.2.8. Зв'язок між феноменами ПРЦ та С-анафазі в червоному кістковому мозку хворих на ГЛЛ дітей в перший гострий період. Кореляція відсутня ($r = 0,111$).

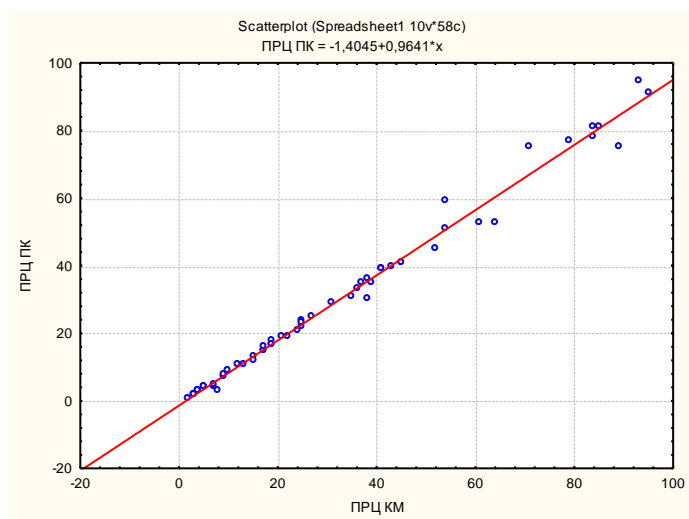


Рис. 20.5.2.8. Зв'язок між феноменами ПРЦ в червоному кістковому мозку та периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей в перший гострий період ($r = 0,994$).

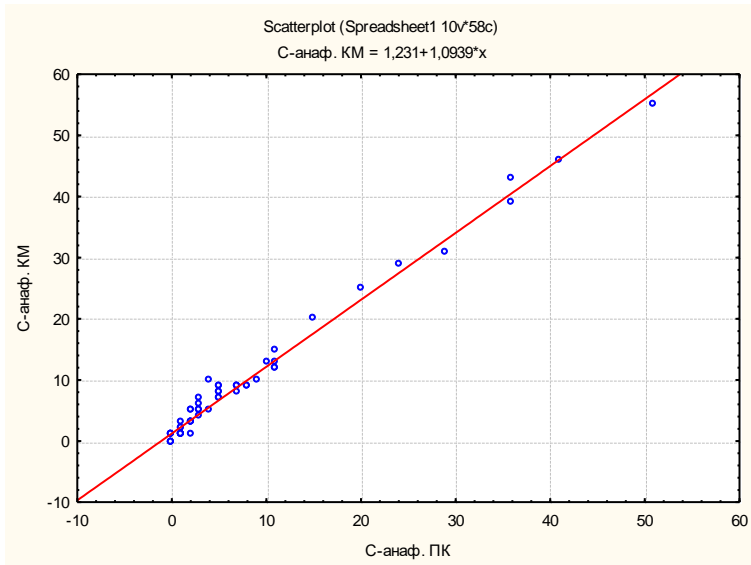


Рис. 20.5.2.8. Зв'язок між феноменами С-анафази в червоному кістковому мозку та периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей в перший гострий період ($r = 0,993$).

На відміну від ПРЦ феномен С-анафази не пов'язаний з рівнем бластів у периферійній крові. Це підтверджує думку про те, що ПРЦ та С-анафаза принципово різні біологічні явища і відіграють зовсім іншу біологічну роль взагалі, і в патогенезі ГЛЛ, зокрема.

Дослідження зв'язків між феноменами ПРЦ та С-анафази показало, що прояв і рівень цих феноменів не пов'язані між собою ні в кістковому мозку, ні в периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей – кореляції відсутні (рис. 20.5.2.5, 20.5.2.6). У той же час нами було виявлено тісний зв'язок – високий рівень кореляції між феноменами ПРЦ в червоному кістковому мозку на периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей ($r = 0,994$) та тісний зв'язок – високий рівень кореляції між феноменами С-анафази в червоному кістковому мозку та периферійній

крові хворих на ГЛЛ дітей ($r = 0,993$) (рис. 20.5.2.7, 20.5.2.8).

Проведено дослідження рівнів ПРЦ та С-анафази при різних формах ГЛЛ в перший гострий період – як по FАВ-класифікації, так і по імунологічній класифікації. Результати досліджень наведені в таблиці 20.5.2.5 та на рис. 20.5.2.9, 20.5.2.10. Тут форми L2 та L3 об'єднані через малу вибірку форми L3.

Таблиця 20.5.2.5. Середні значення феноменів ПРЦ, С-анафази та основних клінічних параметрів при різних формах ГЛЛ в першому гострому періоді.

№ з/п	Форма ГЛЛ	Бласти в ПК (%)	ПРЦ (%)		С-анафаза (%)	
			ПК	КМ	ПК	КМ
1.	L1	40,40 ± 4,43	28,00 ± 4,89	29,80 ± 5,43	9,10 ± 1,65	11,20 ± 1,43
2.	L2	39,13 ± 5,03	29,40 ± 3,76	32,11 ± 4,85	7,32 ± 1,77	9,23 ± 0,78
3.	pre-pre-B	26,75 ± 5,67	14,00 ± 4,57	15,75 ± 5,94	2,50 ± 0,62	3,75 ± 1,76
4.	pre-B	39,41 ± 5,04	30,87 ± 4,00	33,29 ± 4,11	6,68 ± 1,43	8,54 ± 1,59
5.	B	38,00 ± 5,21	28,75 ± 4,23	33,75 ± 3,87	14,00 ± 4,34	16,50 ± 3,28
6.	T	50,00 ± 15,63	20,00 ± 5,65	22,00 ± 6,76	5,80 ± 1,52	8,40 ± 1,98

Як бачимо, щодо форм ГЛЛ по FАВ-класифікації не простежується статистично достовірної відмінності по рівнях ПРЦ та С-анафази. У той же час чітко простежуються статистично достовірні відмінності між різними формами ГЛЛ за імунологічною класифікацією по рівнях ПРЦ і особливо по рівню С-анафази.

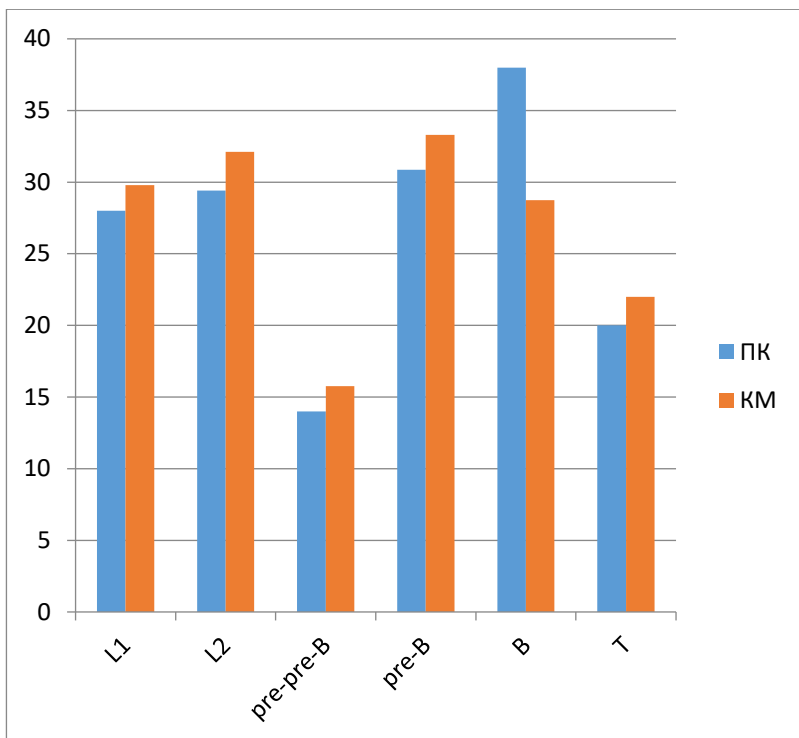


Рис. 20.5.2.9. Рівні феномену ПРЦ (%) в периферійній крові та кістковому мозку хворих на різні форми ГЛЛ в перший гострий період. Найвищі рівні ПРЦ спостерігалися в кістковому мозку хворих на В-ГЛЛ, та периферійній крові хворих на pre-B-ГЛЛ. Найнижчі рівні ПРЦ спостерігалися при pre-pre-B-ГЛЛ.

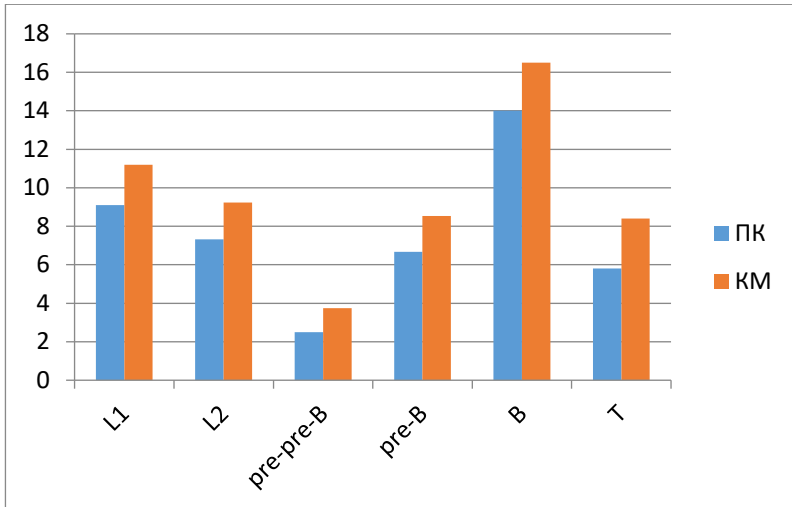


Рис. 20.5.2.10. Рівні феномену С-анафази (%) в периферійній крові та кістковому мозку хворих на різні форми ГЛЛ в перший гострий період. Найвищі рівні ПРЦ спостерігалися в кістковому мозку та периферійній крові хворих на В-ГЛЛ. Найнижчі рівні ПРЦ спостерігалися при pre-pre-B-ГЛЛ.

Це дозволяє пропонувати визначення ПРЦ та С-анафази як додатковий критерій не тільки діагностики ГЛЛ, але і діагностики імунологічних форм ГЛЛ, що мають різний перебіг захворювання. Не виключено, що при різних формах ГЛЛ задіяні різні молекулярні механізми, що впливають на поведінку центромери. Хоча, в наших дослідженнях вибірка Т- та В-форм ГЛЛ мала і тут потрібні додаткові дослідження.

Були проведені дослідження зв'язку феноменів ПРЦ та С-анафази з нестабільністю геному. Для цього було досліджено зв'язок рівня ПРЦ та С-анафази з частотою появи анеуплоїдних та поліплоїдних клонів клітин, що

фіксувалися у досліджених хворих на ГЛЛ. Результати досліджень представлені в таблиці 20.5.2.6.

Таблиця 20.5.2.6. Рівень поліплоїдних (Пол.) та анеуплоїдних (Ан.) клонів у периферійній крові досліджених хворих на ГЛЛ дітей.

№ з/п	Хворий	Форма ГЛЛ	Бласти в ПК (%)	ПРЦ в ПК (%)	Ан. (%)	Пол. (%)
1	БС ♂	pre-pre-B	60	29	4	3
2	МЛ ♀	T	41	22	3	2
3	НВ ♂	pre-B	12	19	5	1
4	ЧО ♀	pre-B	10	13	4	0
5	ГВ ♂	pre-B	16	15	2	1
6	КЛ ♀	B	7	4	0	0
7	ЗВ ♂	pre-B	25	19	3	2
8	ШС ♂	pre-B	93	53	48	7
9	ПМ ♀	pre-B	4	9	1	2
10	ХМ ♀	pre-B	0	3	0	0
11	КК ♂	pre-B	62	35	10	3
12	МК ♀	pre-B	45	33	9	4
13	АП ♂	B	43	30	10	3
14	СО ♀	pre-B	6	3	0	0
15	СН ♀	pre-B	10	41	12	5
16	НЮ ♂	pre-B	18	17	6	2
17	СС ♀	pre-B	64	36	11	4
18	ГХ ♀	pre-B	79	39	15	5
19	ІР ♂	pre-B	30	15	4	1
20	ГЛ ♀	T	38	18	5	2
21	ХА ♂	pre-B	29	16	4	3
22	БВ ♂	pre-B	92	45	17	5
23	ВО ♂	pre-B	5	3	0	0
24	ММ ♀	pre-B	4	2	0	0
25	ДА ♂	pre-B	20	31	0	2
26	ФО ♂	pre-B	50	25	9	2
27	ГР ♂	pre-B	0	2	0	0
28	КО ♂	pre-B	10	7	4	1

29	ТБ ♂	pre-B	78	40	19	3
30	КТ ♀	pre-pre-B	47	21	7	2
31	ЧР ♂	pre-B	44	24	8	3
32	КЕ ♂	pre-B	15	8	3	1
33	ЛУ ♀	pre-B	100	75	51	9
34	ПО ♀	pre-B	9	12	3	2
35	КМ ♂	pre-B	43	53	19	6
36	ЧМ ♂	B	2	3	0	0
37	СТ ♂	pre-B	2	4	0	0
38	БЛ ♀	pre-B	78	59	25	7
39	КН ♀	pre-B	73	51	18	5
40	СН ♀	pre-B	23	11	3	1
41	ЗМ ♂	pre-B	35	17	5	2
42	СО ♂	pre-pre-B	0	2	0	0
43	ШМ ♀	pre-B	3	5	0	0
44	ЛЛ ♀	pre-B	70	35	17	5
45	РД ♂	pre-B	6	11	4	1
46	ПР ♀	pre-pre-B	0	4	1	0
47	РГ ♀	pre-B	3	2	0	0
48	ІС ♀	B	100	78	58	11
49	ГГ ♂	pre-B	100	81	69	13
50	ЛО ♂	pre-B	65	39	14	4
51	БХ ♀	pre-B	74	75	31	8
52	БА ♂	pre-B	81	95	10	11
53	ПЮ ♂	pre-B	52	23	7	0
54	ДА ♂	pre-B	1	1	0	0
55	ТТ ♂	pre-B	95	91	28	14
56	ГА ♂	pre-B	81	77	34	12
57	БЗ ♀	pre-B	90	81	55	16
Сеп.			39,35	29,16	11,56	3,44
Std. Err.			± 4,45	± 3,48	±2,09	±0,51

Дослідження кореляції між рівнем ПРЦ у клітинах периферійної крові та частотою анеуплоїдних та поліплоїдних клонів клітин у периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей показало високий рівень кореляції між цими показниками (для ПРЦ та анеуплоїдії $r = 0,832$; для ПРЦ та поліплоїдії $r = 0,955$) (рис. 20.5.2.11 – 20.5.2.14.).

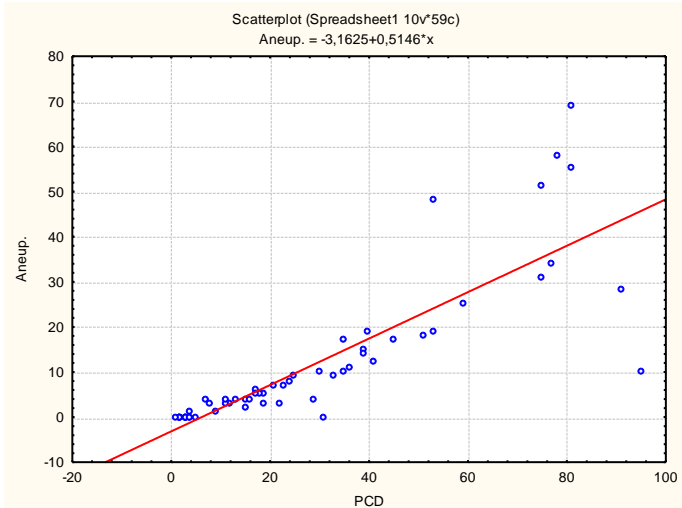


Рис. 20.5.2.11 Лінійна кореляція між частотою ПРЦ в клітинах периферійної крові хворих на ГЛЛ та частотою анеуплоїдних клітин в периферійній крові ($r = 0,832$).

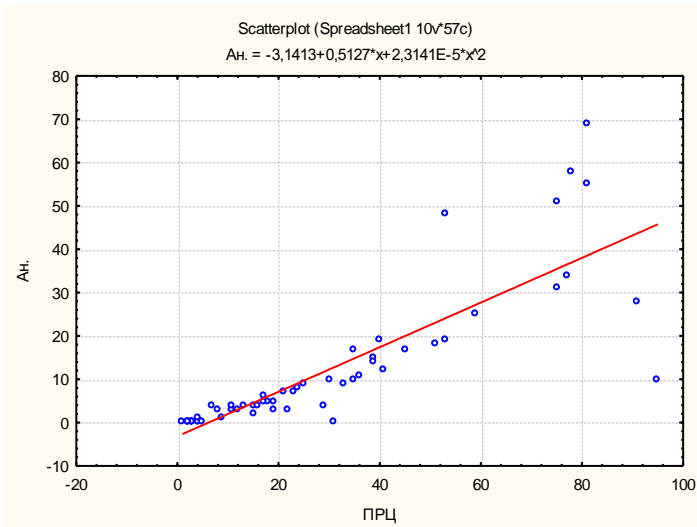


Рис. 20.5.2.12. Нелінійна (поліноміальна) кореляція між частотою ПРЦ в клітинах периферійної крові хворих на ГЛЛ та частотою анеуплоїдних клітин в периферійній крові.

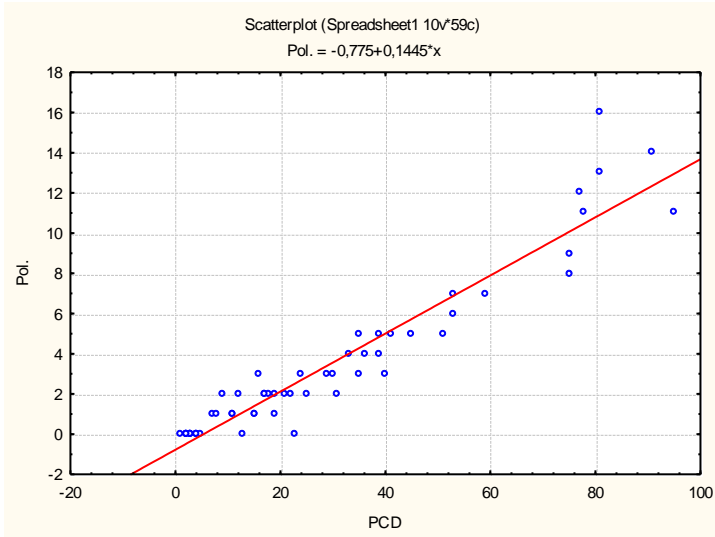


Рис. 20.5.2.13. Лінійна кореляція між частотою ПРЦ в клітинах периферійної крові хворих на ГЛЛ та частотою поліплоїдних клітин в периферійній крові ($r = 0,955$).

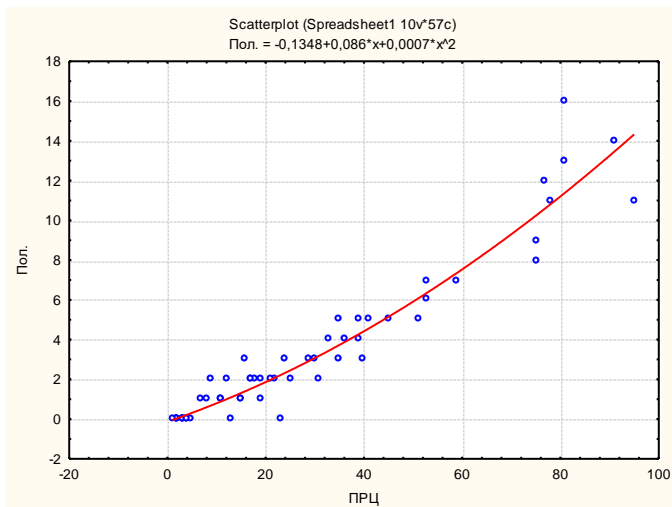


Рис. 20.5.2.14. Нелінійна (поліноміальна) кореляція між частотою ПРЦ в клітинах периферійної крові хворих на ГЛЛ та частотою поліплоїдних клітин в периферійній крові ($r = 0,955$).

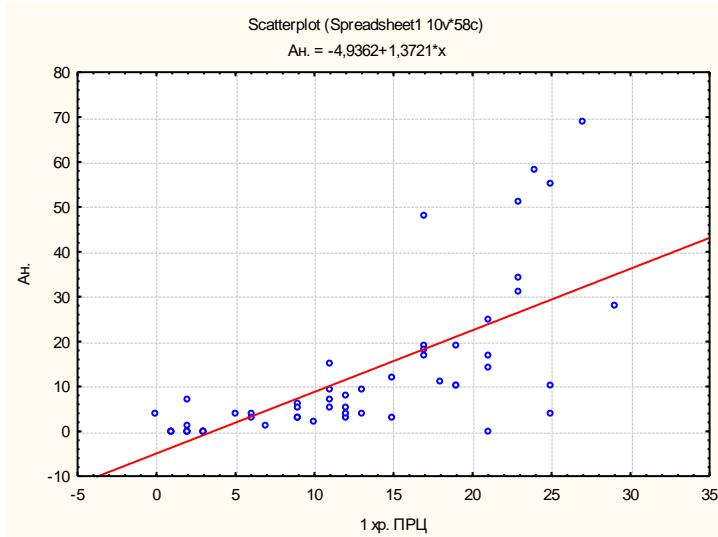


Рис. 20.5.2.15. Лінійна кореляція між однохромосомною ПРЦ (%) і рівнем анеуплоїдії клітин периферійної крові хворих на ГЛЛ дітей ($r = 0,704$).

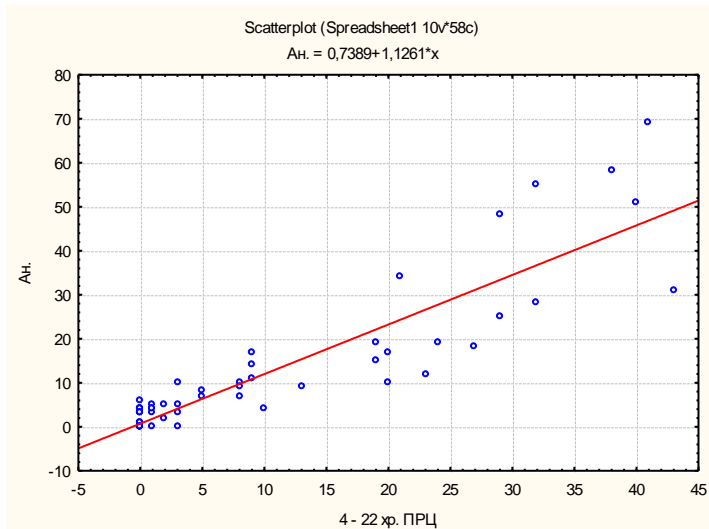


Рис. 20.5.2.16. Лінійна кореляція між 4-22 хромосомною ПРЦ (%) і рівнем анеуплоїдії клітин периферійної крові хворих на ГЛЛ дітей ($r = 0,896$).

Як бачимо, нелінійна кореляція близька за своїми показниками до лінійної.

Отримані результати дозволяють стверджувати, що феномен ПРЦ може бути однією з причин виникнення нестабільності генома при патогенезі ГЛЛ і як наслідок – причиною виникнення анеуплоїдних і поліплоїдних клонів при ГЛЛ, що іноді є більш злякисні, ніж диплоїдні мутантні клони.

Було проведено дослідження не тільки частоти ПРЦ у хворих на ГЛЛ, але і рівень ПРЦ окремих груп хромосом в клітинах периферійної крові хворих на ГЛЛ. Ці дані наведені в табл. 20.5.2.6. та на рис. 20.5.2.17.

Таблиця 20.5.2.6. Передчасне розділення центромер хромосом різних груп у хворих на ГЛЛ дітей. Показане число випадків ГЛЛ хромосом різних груп на 100 досліджених клітин.

№ з/п	Хворий	ПРЦ в ПК (%)	A	B	C	D	E	F	G
1	БС ♂	29	4	1	9	2	11	0	4
2	МЛ ♀	22	3	0	7	0	4	4	5
3	НВ ♂	19	3	1	7	0	4	1	5
4	ЧО ♀	13	3	2	2	0	4	3	3
5	ГВ ♂	15	3	2	3	0	1	1	5
6	КЛ ♀	4	0	0	1	0	1	1	1
7	ЗВ ♂	19	4	1	5	1	2	4	3
8	ШС ♂	53	7	1	26	1	1	3	11
9	ПМ ♀	9	2	0	3	0	1	1	3
10	ХМ ♀	3	1	0	0	0	0	0	3
11	КК ♂	35	1	0	21	2	7	4	9
12	МК ♀	33	5	3	5	2	5	8	6
13	АП ♂	30	1	0	9	1	1	1	5
14	СО ♀	3	1	0	1	0	0	1	1
15	СН ♀	41	5	1	11	1	5	4	15
16	НЮ ♂	17	0	2	2	2	13	2	1

17	СС ♀	36	9	4	17	0	12	0	5
18	ГХ ♀	39	0	0	33	3	14	3	2
19	IP ♂	15	0	2	5	1	1	0	3
20	ГЛ ♀	18	0	0	5	1	1	1	2
21	ХА ♂	16	5	0	7	0	0	0	8
22	БВ ♂	45	0	3	17	2	16	2	3
23	ВО ♂	3	0	0	1	0	0	0	3
24	ММ ♀	2	0	0	0	0	0	0	2
25	ДА ♂	31	5	1	14	1	21	2	6
26	ФО ♂	25	3	0	15	0	5	0	7
27	ГР ♂	2	0	0	0	0	0	0	2
28	КО ♂	7	3	0	6	0	0	0	3
29	ТБ ♂	40	11	1	7	1	5	1	15
30	КТ ♀	21	7	0	5	0	1	0	9
31	ЧР ♂	24	7	0	17	0	13	3	2
32	КЕ ♂	8	0	0	5	0	4	0	3
33	ЛУ ♀	75	1	2	23	0	17	3	5
34	ПО ♀	12	2	3	27	0	28	7	5
35	КМ ♂	53	9	0	51	0	27	6	6
36	ЧМ ♂	3	1	0	0	0	0	0	3
37	СТ ♂	4	1	1	4	0	3	0	2
38	БЛ ♀	59	7	15	64	0	28	5	13
39	КН ♀	51	8	2	35	0	13	2	11
40	СН ♀	11	2	0	3	0	2	0	7
41	ЗМ ♂	17	3	0	5	0	3	0	11
42	СО ♂	2	1	0	0	0	0	0	1
43	ШМ ♀	5	3	0	5	0	1	0	0
44	ЛЛ ♀	35	11	0	7	0	5	0	12
45	РД ♂	11	5	0	11	0	7	1	4
46	ПР ♀	4	0	0	2	0	0	0	3
47	РГ ♀	2	0	0	0	0	0	0	2
48	IC ♀	78	13	1	17	1	5	1	32
49	ГГ ♂	81	15	3	27	2	17	2	19
50	ЛО ♂	39	11	0	17	0	10	0	12
51	БХ ♀	75	5	0	15	0	25	2	3
52	БА ♂	95	14	11	25	7	29	4	18
53	ПЮ ♂	23	5	2	15	1	21	5	8
54	ДА ♂	1	0	0	0	0	0	0	1
55	ТТ ♂	91	13	9	72	6	73	0	0

56	ГА ♂	77	2	4	46	0	46	5	21
57	БЗ ♀	81	0	0	51	0	32	0	23
Ср.			3,81	1,32	13,6	0,64	9,36	1,58	6,71
Std. Err.			±0,5	±0,4	±2,2	±0,21	±1,2	±0,26	±0,82

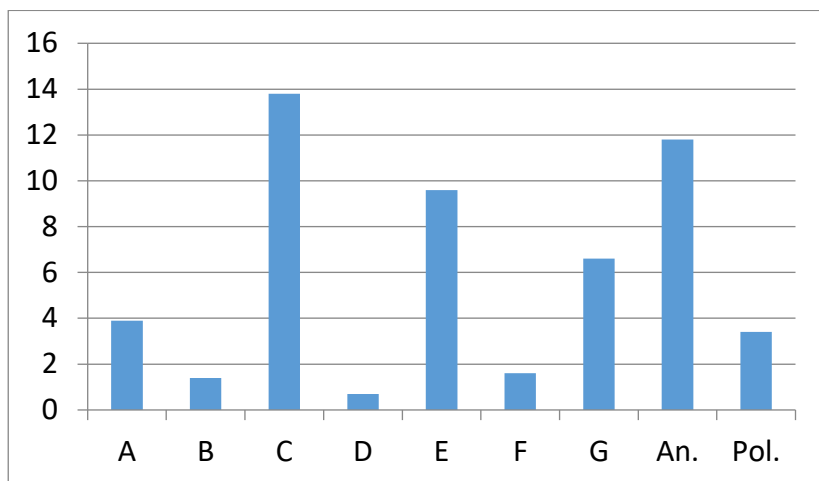


Рис. 20.5.2.17. Рівні ПРЦ окремих груп хромосом (показано число виявлених випадків ПРЦ хромосом різних груп на 100 клітин). Рівні анеуплоїдії та поліплоїдії (%) в периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей.

Як бачимо з діаграми, найчастіше під феномен ПРЦ при ГЛЛ у дітей підпадають хромосоми груп С, Е та G. Найрідше підпадають під ПРЦ при ГЛЛ хромосоми групи D.

Був досліджений не тільки загальний рівень та рівень ПРЦ різних груп хромосом, але і частоти феномену ПРЦ, в який була задіяна різна кількість хромосом. Щодо цього випадки феномену ПРЦ розділили на наступні групи:

1. ПРЦ однієї хромосоми.
2. ПРЦ двох хромосом.

3. ПРЦ трьох хромосом.

4. ПРЦ від 4 до 22 хромосом.

Дані цих досліджень представлені в табл. 20.5.2.7. і відображені на рис. 20.5.2.16.

Таблиця 20.5.2.7. Частоти феномену ПРЦ з участю різної кількості хромосом клітин периферійної крові хворих на ГЛЛ.

№ з/п	Хворий	ПРЦ в ПК (%)	С-анаф. в ПК (%)	1 хр. (%)	2 хр. (%)	3 хр. (%)	4-22 хр. (%)
1	БС ♂	29	0	25	3	1	0
2	МЛ ♀	22	1	15	4	2	1
3	НВ ♂	19	2	12	3	3	1
4	ЧО ♀	13	5	0	0	3	10
5	ГВ ♂	15	8	10	2	1	2
6	КЛ ♀	4	1	3	1	0	0
7	ЗВ ♂	19	2	12	3	1	3
8	ШС ♂	53	11	17	4	3	29
9	ПМ ♀	9	1	7	2	0	0
10	ХМ ♀	3	0	3	0	0	0
11	КК ♂	35	2	19	5	3	8
12	МК ♀	33	1	11	7	2	13
13	АП ♂	30	8	19	5	3	3
14	СО ♀	3	1	2	1	0	0
15	СН ♀	41	0	15	2	1	23
16	НЮ ♂	17	1	9	6	2	0
17	СС ♀	36	20	18	8	1	9
18	ГХ ♀	39	24	11	3	6	19
19	ІР ♂	15	9	13	2	0	0
20	ГЛ ♀	18	7	9	3	3	3
21	ХА ♂	16	2	12	2	1	1
22	БВ ♂	45	5	17	3	5	20
23	ВО ♂	3	0	3	0	0	0
24	ММ ♀	2	0	1	1	0	0
25	ДА ♂	31	3	21	5	2	3

26	ФО ♂	25	5	13	3	1	8
27	ГР ♂	2	0	1	1	0	0
28	КО ♂	7	1	6	1	0	0
29	ТБ ♂	40	5	17	2	2	19
30	КТ ♀	21	3	11	3	2	5
31	ЧР ♂	24	1	12	5	2	5
32	КЕ ♂	8	0	6	2	0	0
33	ЛУ ♀	75	11	23	7	5	40
34	ПО ♀	12	36	9	3	0	0
35	КМ ♂	53	7	19	7	3	24
36	ЧМ ♂	3	36	1	1	1	0
37	СТ ♂	4	1	2	1	1	1
38	БЛ ♀	59	41	21	5	4	29
39	КН ♀	51	11	17	4	3	27
40	СН ♀	11	2	9	1	1	0
41	ЗМ ♂	17	3	11	3	1	2
42	СО ♂	2	51	2	0	0	0
43	ШМ ♀	5	3	3	2	1	0
44	ЛЛ ♀	35	7	21	5	0	9
45	РД ♂	11	4	5	4	1	1
46	ПР ♀	4	2	2	1	1	0
47	РГ ♀	2	3	2	0	0	0
48	ИС ♀	78	11	24	9	7	38
49	ГГ ♂	81	10	27	10	3	41
50	ЛЮ ♂	39	7	21	5	4	9
51	БХ ♀	75	15	23	6	3	43
52	БА ♂	95	5	25	15	35	20
53	ПЮ ♂	23	29	2	11	2	8
54	ДА ♂	1	0	1	0	0	0
55	ТТ ♂	91	2	29	21	9	32
56	ГА ♂	77	4	23	11	12	21
57	БЗ ♀	81	5	25	13	11	32
Ср.		29,16	7,63	12,23	4,16	2,77	9,86
Std. Err.		± 3,48	± 1,50	± 1,10	± 0,54	± 0,67	± 1,71

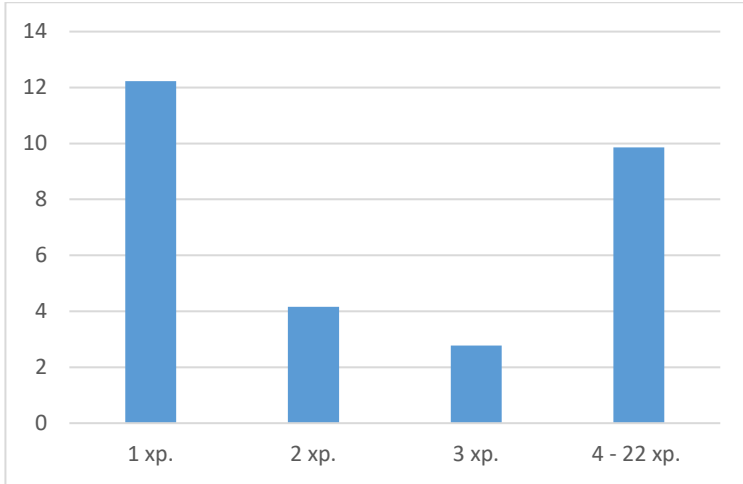


Рис. 20.5.2.18. Частоти ПРЦ із залученням у феномен різного числа хромосом у периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей.

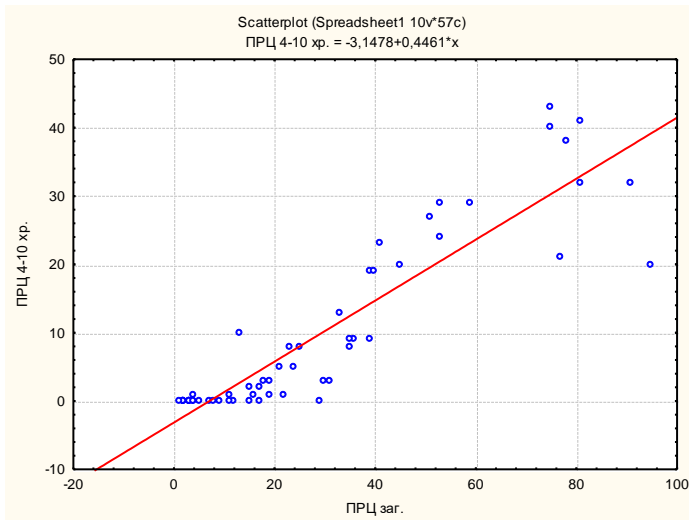


Рис. 20.5.2.19. Лінійна кореляція між загальним рівнем ПРЦ і рівнем ПРЦ, в який задіяно від 4 до 10 хромосом у периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей ($r = 0,907$).

Як бачимо, при ГЛЛ в клітинах периферійної крові найбільш висока форма ПРЦ та, що охоплює всього одну хромосому. Форми ПРЦ, що охоплюють дві або три хромосоми трапляються значно рідше. Простежується висока позитивна кореляція між загальною частотою ПРЦ (а значить і бластозом) і частотою ПРЦ, що охоплює від 4 до 22 хромосом. При низькому рівні ПРЦ ця форма ПРЦ іноді не трапляється взагалі. Щодо інших форм ПРЦ (що охоплюють 1, 2, 3 хромосоми), то така кореляція менш очевидна (для однохромосомної ПРЦ кореляція з загальним рівнем ПРЦ $r = 0,887$).

Крім хворих на ГЛЛ дітей на різних стадіях перебігу захворювання було здійснено комплексний цитогенетичний аналіз 20 батьків хворих на ГЛЛ. Дані по цьому контингенту людей були отримані суперечливі. Коли забір крові проводився в день госпіталізації дитини, то в цих людей був відмічений підвищений рівень ПРЦ та С-анафази, хоча і значно нижчий, ніж у хворих людей в період бластної кризи. Коли ж забір крові у цих же людей проводився значно пізніше, то показники були близькі до значень рівня ПРЦ та С-анафази в контрольній групі. Це навело на думку, що підвищені рівні ПРЦ та С-анафази могли виникнути внаслідок стресу, а не в результаті наявності якоїсь спадкової патології. Але загалом, це потребує додаткових досліджень.

Окремо слід сказати і про культури клітин периферійної крові, що вирощувались без ФГА. В окремих випадках вдавалось отримувати хромосомні препарати з таких культур. І в кожному випадку відмічався 100 % рівень ПРЦ в таких культурах клітин. У пацієнтів з тотальним бластозом (рівень бластів в периферійній крові становив 100%) рівень ПРЦ + С-анафази сумарно складав 88 – 100 %, що теж підтверджувало думку, що ці феномени в більш степені притаманні бластним клітинам при ГЛЛ,

аніж нормальним клітинам крові – як в периферійній крові так і в червоному кістковому мозку.

Було проведено дослідження прогностичного значення ПРЦ та С-анафази при ГЛЛ. Для цього аналізувалися три групи хворих з 57 досліджених хворих на ГЛЛ дітей в перший гострий період:

1. Хворі з високою летальністю, що померли не досягнувши ремісії.
2. Хворі, що померли внаслідок рецидиву захворювання після короткочасної ремісії.
3. Хворі, що досягли тривалої ремісії.

У результаті проведених досліджень було виявлено статистично достовірні відмінності щодо рівня С-анафази у цих трьох групах хворих. Результати наведені в таблицях 20.5.2.8 - 20.5.2.11 та на рис. 20.5.2.18.

Таблиця 20.5.2.8. Значення рівнів ПРЦ та С-анафази у хворих на ГЛЛ дітей з високою летальністю, що не досягли ремісії після стандартного лікування.

№ з/п	Хворий, стать	Форма ГЛЛ		Бласти в ПК (%)	ПРЦ (%)		С-анафаза (%)	
		Імун.	ФАВ		ПК	КМ	ПК	КМ
1	БС ♂	pre-pre-B	L2	60	29	31	0	1
2	МЛ ♀	T	L2	41	22	25	1	1
3	КЛ ♀	B	L2	7	4	5	1	2
4	ПМ ♀	pre-B	L1	4	9	10	1	1
5	СН ♀	pre-B	L2	10	41	45	0	1
6	НЮ ♂	pre-B	L1	18	17	19	1	1
7	ВО ♂	pre-B	L2	5	3	4	0	0
8	ММ ♀	pre-B	L1	4	2	3	0	1
9	ЧР ♂	pre-B	L2	44	24	25	1	1
10	ТТ ♂	pre-B	L3	95	91	95	2	3
11	ГА ♂	pre-B	L1	81	77	79	4	5
Сеп.				33,54	29,00	31,00	1,00	1,54
Std. Err.				± 9,98	± 9,02	± 9,26	± 0,36	± 0,41

Таблиця 20.5.2.9. Значення рівнів ПРЦ та С-анафази у хворих на ГЛЛ дітей, що померли внаслідок швидкого рецидиву (рецидивів), після стандартного лікування.

№ з/п	Хворий, стать	Форма ГЛЛ		Бласти в ПК (%)	ПРЦ (%)		С-анафаза (%)	
		Імун.	FAV		ПК	КМ	ПК	КМ
1	НВ ♂	pre-B	L1	12	19	21	2	3
2	КК ♂	pre-B	L1	62	35	39	2	5
3	МК ♀	pre-B	L1	45	33	36	1	3
4	СО ♀	pre-B	L2	6	3	4	1	2
5	ХА ♂	pre-B	L2	29	16	17	2	3
6	ДА ♂	pre-B	L2	20	31	35	3	5
7	КО ♂	pre-B	L2	10	7	9	1	1
8	КТ ♀	pre-pre-B	L2	47	21	24	3	5
9	ГГ ♂	T	L2	100	81	85	10	13
10	ЛО ♂	T	L1	65	39	41	7	9
Сеп.				39,60	28,50	31,10	3,2	4,9
Std. Err.				± 9,51	± 6,95	± 7,21	± 0,94	± 1,14

Таблиця 20.5.2.9. Значення рівнів ПРЦ та С-анафази у хворих на ГЛЛ дітей, що досягли тривалої ремісії після стандартного лікування.

№ з/п	Хворий, стать	Форма ГЛЛ		Бласти в ПК (%)	ПРЦ (%)		С-анафаза (%)	
		Імун.	FAV		ПК	КМ	ПК	КМ
1	ЧО ♀	pre-B	L1	10	13	15	5	8
2	ГВ ♂	pre-B	L2	16	15	17	8	9
3	ШС ♂	pre-B	L2	93	53	64	11	15
4	ХМ ♀	pre-B	L2	0	3	4	0	1
5	АП ♂	B	L2	43	30	38	8	9
6	СС ♀	pre-B	L1	64	36	38	20	25
7	ГХ ♀	pre-B	L2	79	39	41	24	29
8	ІР ♂	pre-B	L1	30	15	17	9	10
9	ГЛ ♀	T	L1	38	18	19	7	9
10	БВ ♂	pre-B	L2	92	45	52	5	9
11	ФО ♂	pre-B	L1	50	25	27	5	7

12	ГР ♂	pre-B	L2	0	2	3	0	0
13	ТБ ♂	pre-B	L1	78	40	43	5	8
14	КЕ ♂	pre-B	L2	15	8	9	0	0
15	ЛУ ♀	pre-B	L2	100	75	89	13	11
16	ПО ♀	pre-B	L2	9	12	15	36	39
17	КМ ♂	pre-B	L2	43	53	61	7	8
18	ЧМ ♂	B	L2	2	3	8	36	43
19	СТ ♂	pre-B	L1	2	4	7	1	1
20	БЛ ♀	pre-B	L1	78	59	54	41	46
21	КН ♀	pre-B	L1	73	51	54	11	12
22	СН ♀	pre-B	L2	23	11	13	2	5
23	ЗМ ♂	pre-B	L2	35	17	19	3	7
24	СО ♂	pre-pre-B	L2	0	2	3	51	55
25	ШМ ♀	pre-B	L1	3	5	7	3	6
26	ЛЛ ♀	pre-B	L1	70	35	37	7	9
27	РД ♂	T	L2	6	11	12	4	10
28	ПР ♀	pre-pre-B	L1	0	4	5	2	1
29	РГ ♀	pre-B	L2	3	2	3	3	4
30	ІС ♀	B	L2	100	78	84	11	12
31	БХ ♀	pre-B	L3	74	75	71	15	20
32	БА ♂	pre-B	L1	81	95	93	5	7
33	ПЮ ♂	pre-B	L3	52	23	25	29	31
34	ДА ♂	pre-B	L2	1	1	2	0	0
35	ЗВ ♂	pre-B	L1	25	19	22	2	3
36	БЗ ♀	pre-B	L1	90	81	84	5	9
Сер.				41,06	29,39	32,08	10,94	13,28
Std. Err.				± 5,89	± 4,49	± 4,63	± 2,13	± 2,31

Як бачимо із наведених даних статистично достовірна відмінність між цими трьома групами хворих стосується тільки рівнів С-анафазу в першому гострому періоді. У хворих, що померли не досягши ремісії, рівні С-анафазу в перший гострий період були мінімальні, значно вищими були рівні С-анафазу в перший гострий період у хворих, що померли внаслідок швидкого рецидиву. У кілька разів перевищували ці значення рівні С-анафазу в хворих на ГЛЛ, що досягли тривалої ремісії.

Таблиця 20.5.2.11. Прогностичне значення С-анафазу при ГЛЛ. Наведені середні значення рівня С-анафазу в перший гострий період (першої бластної кризи).

Контингент	ПК	КМ
Контрольна група	0	0
Леталь	1,00 ± 0,36	1,54 ± 0,41
Швидкий рецидив	3,2 ± 0,94	4,9 ± 1,14
Тривала ремісія	10,94 ± 2,13	13,28 ± 2,31

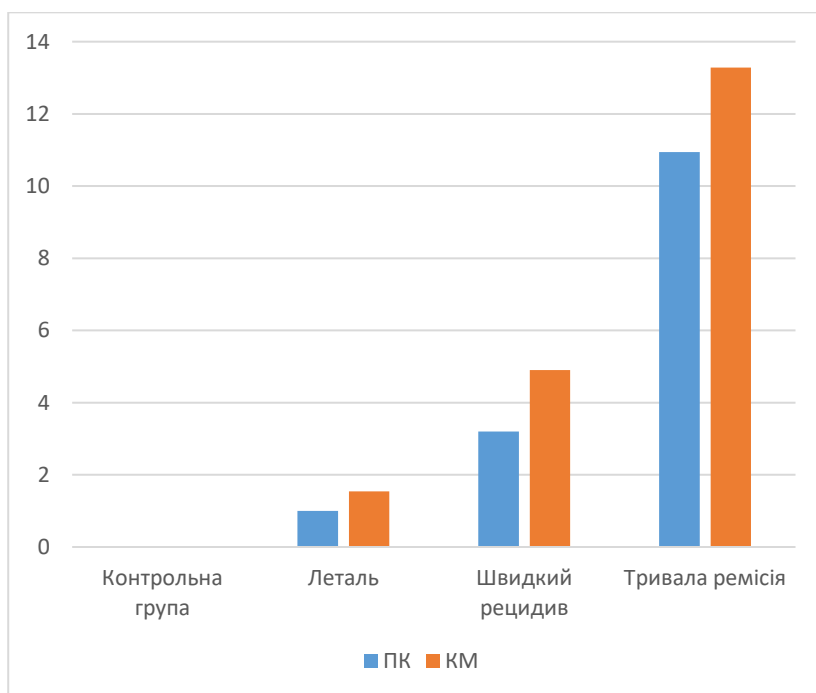


Рис. 20.5.2.20. Значення рівнів С-анафазу в перший гострий у різних групах хворих на ГЛЛ дітей – що померли і не досягли ремісії, що мали швидкий рецидив і що досягли тривалої ремісії.

Отже, виходячи з цих результатів ми можемо пропонувати визначення рівня С-анафази не тільки як додатковий діагностичний маркер, але і як прогностичний маркер перебігу ГЛЛ у дітей.

Були проведені дослідження зв'язку феномену С-анафази з феноменом апоптозу. Для цього у 10 хворих на ГЛЛ дітей проводились паралельні визначення рівня С-анафази в клітинах периферійної крові та червоного кісткового мозку в першому гострому періоді до початку лікування і визначення клітин з прогресуючою втратою ДНК там же – методами проточної цитофлуориметрії. Умовно ми вважали, що саме ці клітини є апоптичними клітинами, хоча однозначно стверджувати це ми не можемо. Приклади діаграм цитофлуориметрії, на основі яких ми робили певні висловки, наведено на рис. 20.2.5 – 20.2.7. Рівень клітин з прогресуючою втратою ДНК у досліджених пацієнтів коливався в широкому діапазоні – від 0 до 16,7 %. і становив в середньому для клітин червоного кісткового мозку $6,29 \pm 1,86$ % і для периферійної крові $5,32 \pm 1,61$. У період ремісії у хворих на ГЛЛ дітей рівень клітин з прогресуючою втратою ДНК коливався від 0 до 3,01 % і складав в середньому $1,7 \pm 0,33$ %. У контрольній групі рівень таких клітин коливався від 0 до 0,3 % і складав в середньому $0,12 \pm 0,05$ %. Результати паралельного визначення рівня С-анафази та рівня клітин з прогресуючою втратою ДНК наведено в табл. 20.5.2.12. Було виявлено високу позитивну кореляцію між рівнями С-анафази та рівнями клітин з прогресуючою втратою ДНК (які ми вважали апоптичними) як в клітинах червоного кісткового мозку ($r = 0,990$), так і в клітинах периферійної крові хворих на ГЛЛ ($r = 0,976$). Це може бути свідченням зв'язку явищ С-анафази та апоптозу, або їх зв'язку з якимось третім явищем. Ці питання потребують подальших досліджень.

Таблиця 20.5.2.12. Результати паралельних досліджень рівнів С-анафаз та рівнів клітин з прогресуючою втратою ДНК (А) у хворих на ГЛЛ дітей.

№ з/п	Пацієнт	КМ		ПК	
		С-анаф. (%)	А (%)	С-анаф. (%)	А (%)
1	НЮ ♂	1	1,19	1	2,67
2	СС ♀	25	15,89	20	13,05
3	ГХ ♀	29	16,70	24	14,25
4	ІР ♂	10	7,54	9	8,02
5	ГЛ ♀	9	5,78	7	6,87
6	ХА ♂	3	1,89	2	2,87
7	БВ ♂	9	7,65	5	3,32
8	ВО ♂	0	0	0	0
9	ММ ♀	1	2,23	0	0,14
10	ДА ♂	5	4,07	3	1,99
Сер.		9,20	6,29	7,10	5,32
Std. err.		± 3,19	± 1,86	± 2,67	± 1,61

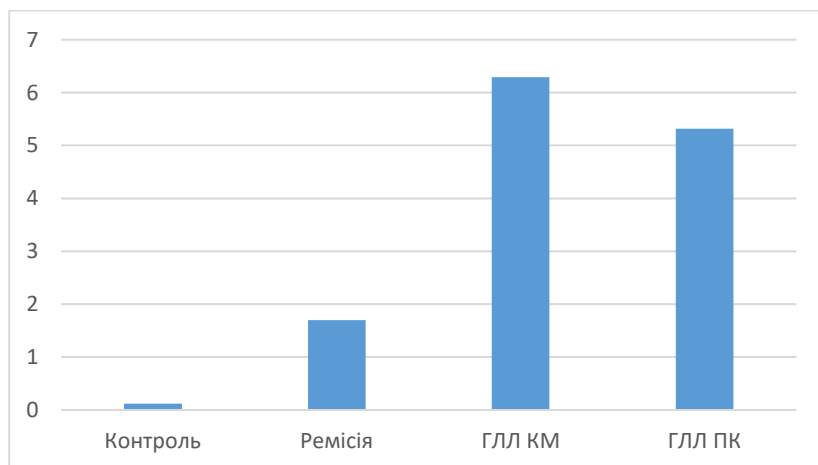


Рис. 20.5.2.22. Рівень клітин з прогресуючою втратою ДНК в контрольній групі і при ГЛЛ – в період ремісії та в першому гострому періоді – в червоному кістковому мозку та в периферійній крові.

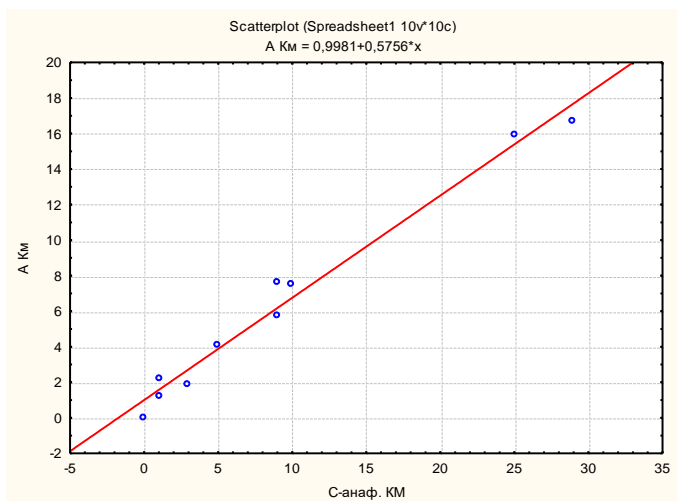


Рис. 20.5.2.23. Лінійна кореляція між рівнем С-анафази в червоному кістковому мозку хворих на ГЛЛ дітей (%) та рівнем клітин з прогресуючою втратою ДНК (А) (%) там же ($r = 0,990$).

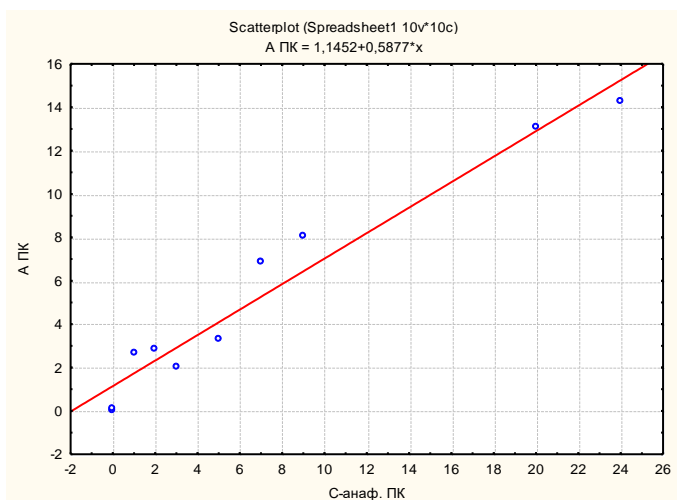


Рис. 20.5.2.24. Лінійна кореляція між рівнем С-анафази в периферійній крові хворих на ГЛЛ дітей (%) та рівнем клітин з прогресуючою втратою ДНК там же (А) (%) ($r = 0,976$).

20.6. Феномени передчасного розділення центромер та С-анафазу у хворих на гострий мієлобластний лейкоз

Крім хворих на ГЛЛ, було досліджено хворих на інші гематологічні та онкологічні захворювання, в тому числі хворих на гострий мієлобластний лейкоз (ГМЛ). Вибірка хворих з іншими патологіями суттєво менша, ніж хворих на ГЛЛ, але простежуються закономірності варті уваги.

У результаті проведених досліджень 30 пацієнтів хворих на ГМЛ в перший гострий період було встановлено у кожного пацієнта частоту передчасного розділення центромер метафазних хромосом в культурі клітин периферійної крові та кісткового мозку. У цих же пацієнтів було досліджено рівень бластних клітин у периферійній крові та інші клінічні показники (табл. 20.6.1, 20.6.2).

Контингент хворих на ГМЛ дітей був наступний: досліджено 29 хворих дітей віком від 0 до 14 років і один дорослий хворий на ГМЛ віком 46 років. Було досліджено 30 пацієнтів в I гострий період і 1 пацієнт в період ремісії. Оскільки 1 пацієнт є поодиноким випадком і не може бути об'єктом статистичної обробки результатів, результати досліджень цього пацієнта не включені у вибірку. Розподіл за статтю досліджених пацієнтів був таким: серед досліджених пацієнтів хворих на ГМЛ дітей особин чоловічої статі набагато більше, ніж особин жіночої статі: 20 і 10 відповідно – співвідношення 2:1. Це відповідає даним літератури, що це захворювання набагато частіше трапляється у чоловіків, аніж у жінок (табл. 20.6.1, рис. 20.6.1).

Розподіл по вікових групах був наступний:

1. Від 0 до 1 року – 2 пацієнти.
2. Від 2 до 4 років – 3 пацієнтів.
3. Від 5 до 7 років – 4 пацієнт.

4. Від 8 до 10 років – 5 пацієнтів.
5. Від 11 до 14 років – 15 пацієнтів.
6. Від 14 до 50 років – 1 пацієнт.

Найбільше пацієнтів було виявлено з М1 формою ГМЛ – 18 пацієнтів (табл. 20.6.1, рис. 20.6.2.). Форми М0, М3, М8 не траплялися жодного разу серед досліджених пацієнтів. Загалом, серед 30 досліджених пацієнтів хворих на ГМЛ було з формами: М1 – 18 хворих, М0 – 0, М2 – 2, М3 – 0, М4 – 4, М5 – 2, М5а – 2, М6 – 0, М7 – 2, М8 – 0 хворих. Ці дані корелюють з даними інших дослідників – низка форм ГМЛ (наприклад, М8) є дуже рідкісними.

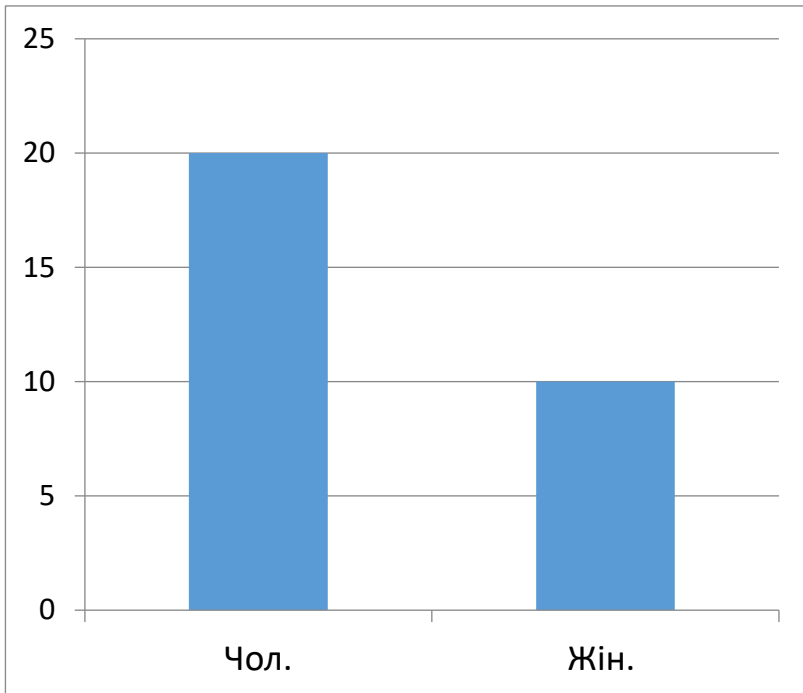


Рис. 20.6.1. Співвідношення числа людей різної статі серед досліджених хворих на ГМЛ.

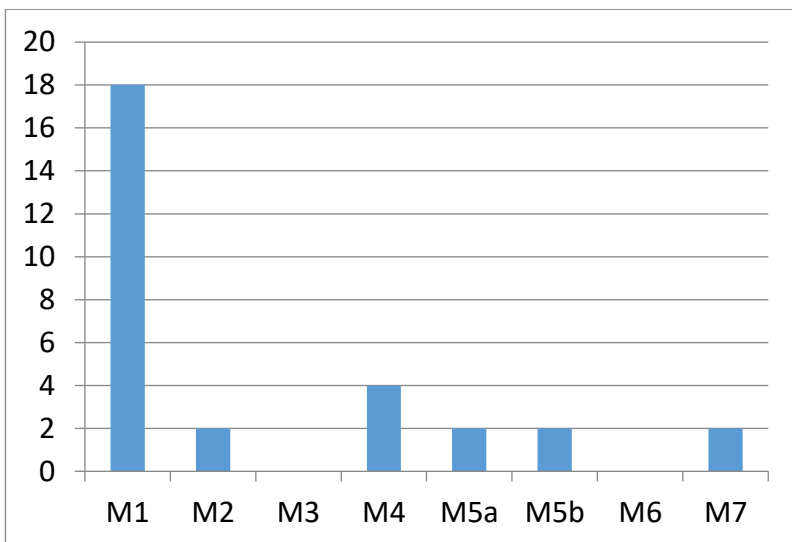


Рис. 20.6.1. Співвідношення числа досліджених пацієнтів з різними формами ГМЛ.

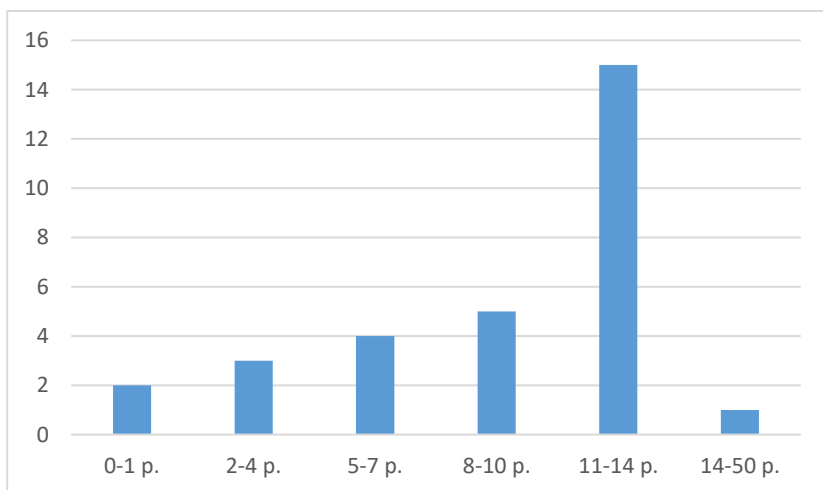


Рис. 20.6.3. Кількість досліджених пацієнтів з ГМЛ різного віку.

За рівнем злоякісних бластних клітин у периферійній крові досліджені пацієнти розподілені по наступних групах:

1. 0 % бластів в ПК – 0 пацієнтів.
2. 1 – 2 % бластів в ПК – 1 пацієнт.
3. 3 – 10 % бластів в ПК – 7 пацієнтів.
4. 11 – 25 % бластів в ПК – 13 пацієнтів.
5. 26 – 60 % бластів в ПК – 9 пацієнтів.
6. 61 – 99 % бластів в ПК – 0 пацієнтів.
7. 100 % бластів в ПК – 0 пацієнти.

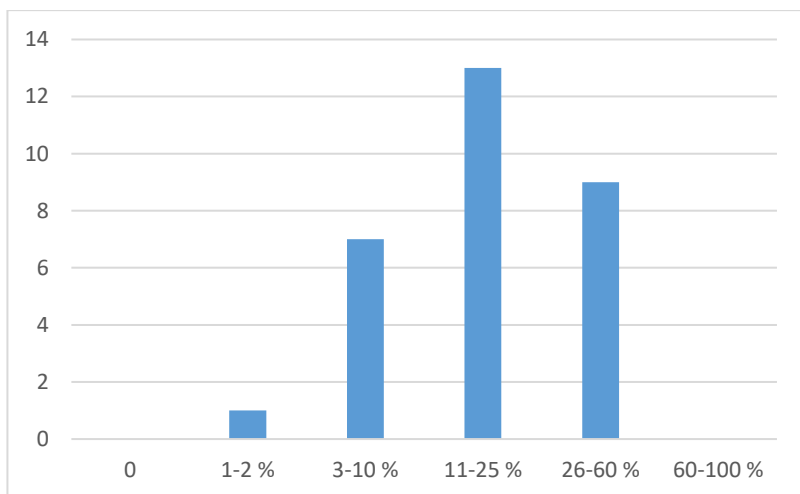


Рис. 20.6.4. Розподіл досліджених хворих на ГМЛ за рівнем бластів у периферійній крові.

За загальним рівнем лейкоцитів у периферійній крові досліджених хворих на ГМЛ можна розділити на наступні групи:

1. 0 – 1 тис./мм³ – 0 пацієнтів.
2. 2 – 8 тис./мм³ – 8 пацієнтів.
3. 9 – 12 тис./мм³ – 3 пацієнтів.

4. 13 – 17 тис./мм³ – 6 пацієнтів.
 5. 18 – 25 тис./мм³ – 6 пацієнтів.
 6. 26 – 40 тис./мм³ – 5 пацієнтів.
 7. 41 – 70 тис./мм³ – 2 пацієнти.
 8. 71 – 100 тис./мм³ – 0 пацієнтів.
 9. 101 – 200 тис./мм³ – 0 пацієнтів.
 10. > 200 тис./мм³ – 0 пацієнтів.
- (Норма становить 4 – 10 тис./мм³).

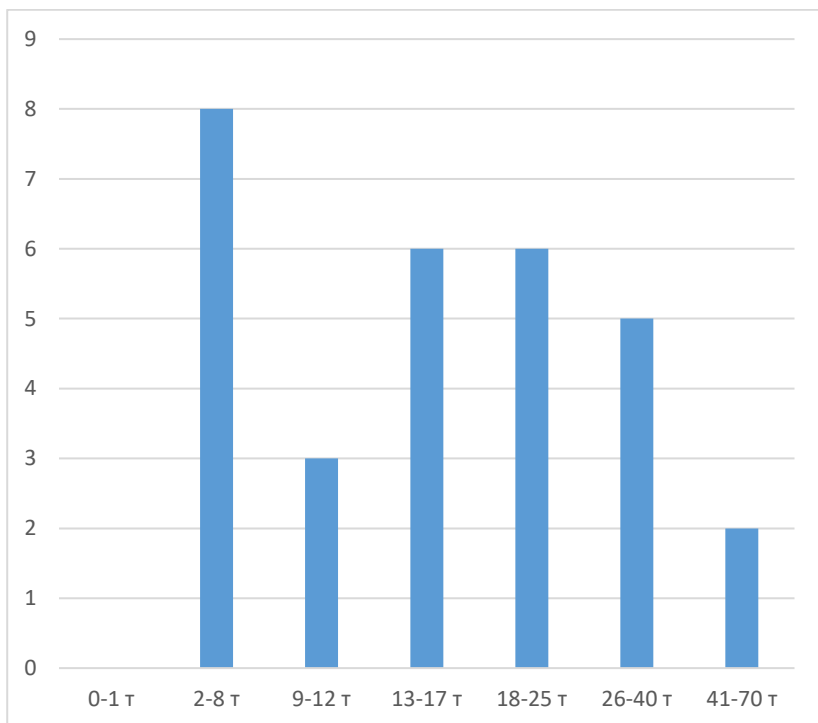


Рис. 20.6.5. Розподіл за категоріями досліджених пацієнтів з ГМЛ по рівню лейкоцитозу (в тис./мм³). Показана кількість досліджених пацієнтів.

Таблиця 20.6.1. Досліджені пацієнти хворі на ГМЛ, рівні ПРЦ та С-анафаза в периферійній крові та кістковому мозку.

№ з/п	Хворий, стать	Форма ГМЛ	Бласти в ПК (%)	ПРЦ (%)		С-анафаза (%)	
				ПК	КМ	ПК	КМ
1	НА ♂	M1	11	9	15	1	3
2	ПМ ♂	M5a	14	11	19	21	27
3	СТ ♂	M1	9	7	11	1	3
4	ПР ♂	M7	15	13	21	3	5
5	ЛГ ♀	M1	7	5	9	11	16
6	ДЛ ♂	M1	21	18	31	3	4
7	ДН ♂	M1	2	1	5	0	1
8	НН ♀	M7	25	23	29	3	5
9	ПО ♀	M1	47	39	63	5	3
10	ВР ♂	M1	33	27	41	3	2
11	ТО ♂	M1	25	20	32	2	1
12	ЛД ♂	M5b	14	11	25	1	3
13	ТП ♂	M2	51	43	78	11	13
14	ОО ♂	M1	32	27	43	3	5
15	АВ ♂	M4	11	9	15	1	2
16	СК ♀	M5a	7	5	11	12	15
17	НБ ♂	M1	19	17	25	3	4
18	ФН ♂	M1	23	19	29	3	4
19	ГМ ♀	M2	17	14	21	2	3
20	ММ ♂	M1	34	27	39	4	7
21	ПГ ♀	M4	3	2	5	15	11
22	ВВ ♂	M1	7	5	9	1	2
23	АО ♀	M5b	43	39	59	4	5
24	УК ♀	M4	59	49	89	12	17
25	РЛ ♂	M1	18	16	23	3	7
26	БЯ ♂	M1	26	24	35	3	9
27	МС ♀	M4	28	27	33	4	5
28	ІР ♂	M1	11	9	14	2	4
29	НР ♀	M1	9	6	10	3	7
30	АК ♂	M1	7	8	9	11	17
Сеп.			20,93	17,67	28,27	5,03	7,00
Std. Err.			± 2,68	± 2,31	± 3,84	± 0,92	± 1,12

Таблиця 20.6.2. Пацієнти хворі на ГМЛ, їх клінічні показники (гемоглобін – Нб., лейкоцити - Leu., тромбоцити - Tr.) в перший гострий період до початку лікування.

№ з/п	Хворий, стать	Форма ГМЛ	Бласти в ПК (%)	Нб. (г/л)	Leu. (тис./мм ³)	Tr. (тис./мм ³)
1	НА ♂	M1	11	87	12	87
2	ПМ ♂	M5a	14	61	17	49
3	СТ ♂	M1	9	73	3	90
4	ПР ♂	M7	15	79	31	19
5	ЛГ ♀	M1	7	76	11	65
6	ДЛ ♂	M1	21	62	43	38
7	ДН ♂	M1	2	88	7	96
8	НН ♀	M7	25	81	22	43
9	ПО ♀	M1	47	56	16	16
10	ВР ♂	M1	33	59	15	70
11	ТО ♂	M1	25	65	6	76
12	ЛД ♂	M5b	14	86	24	59
13	ТП ♂	M2	51	64	13	55
14	ОО ♂	M1	32	71	32	71
15	АВ ♂	M4	11	79	5	57
16	СК ♀	M5a	7	68	4	111
17	НБ ♂	M1	19	57	21	64
18	ФН ♂	M1	23	69	15	43
19	ГМ ♀	M2	17	54	14	79
20	ММ ♂	M1	34	65	20	83
21	ПГ ♀	M4	3	51	2	230
22	ВВ ♂	M1	7	87	8	102
23	АО ♀	M5b	43	70	32	58
24	УК ♀	M4	59	76	19	69
25	РЛ ♂	M1	18	93	42	79
26	БЯ ♂	M1	26	79	34	81
27	МС ♀	M4	28	85	30	97
28	ІР ♂	M1	11	70	21	107
29	НР ♀	M1	9	78	7	156
30	АК ♂	M1	7	88	10	190
Сер.			20,93	72,57	17,87	81,33
Std. Err.			± 2,68	± 2,11	± 2,08	± 8,26

Було досліджено рівень ПРЦ та С-анафази в КМ та ПК у хворих на ГМЛ та в контрольній групі – нормальних здорових дітей, що проходили обстеження, та донорів. Було виявлено, що у хворих на ГМЛ в перший гострий період рівень ПРЦ в середньому у периферійній крові (ПК) становив $17,67 \pm 2,31$; в кістковому мозку (КМ) становив $28,27 \pm 3,84$. Рівень С-анафази у хворих на ГМЛ становив відповідно в ПК $5,03 \pm 0,92$; КМ $7,0 \pm 1,12$. Значення ПРЦ та С-анафази в ПК та КМ статистично достовірно відрізнялися – у КМ відповідні значення були вищими. Крім того, значення рівня ПРЦ та С-анафази при ГМЛ в перший гострий період статистично достовірно відрізнялися від цих значень у контрольній групі: ПРЦ становило в контрольній групі в ПК $1,7 \pm 0,3$; в КМ $3,0 \pm 0,3$. С-анафаза – 0 (не зустрічалася взагалі) (рис. 20.6.6, табл. 20.6.3).

Це дозволяє пропонувати визначення ПРЦ та С-анафази як додатковий діагностичний критерій ГМЛ.

Таблиця 20.6.3. Середні значення рівнів ПРЦ та С-анафази в периферійній крові (ПК) та кістковому мозку (КМ) в хворих на ГМЛ та в контрольній групі.

Група	ПРЦ		С-анафаза	
	ПК	КМ	ПК	КМ
Контроль	$1,7 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	0	0
ГМЛ	$17,67 \pm 2,31$	$28,27 \pm 3,84$	$5,03 \pm 0,92$	$7,0 \pm 1,12$

Слід ще окремо сказати про одного хворого на ГМЛ в період ремісії. Один пацієнт не складає статистичної групи, тому і висновки робити не можна, але в цього пацієнта простежувались високі рівні ПРЦ та С-анафази в клітинах: рівень ПРЦ в КМ становив 12 %, в ПК становив 10 відсотків. Рівень С-анафази в КМ становив 6 %, а в ПК – 0%.

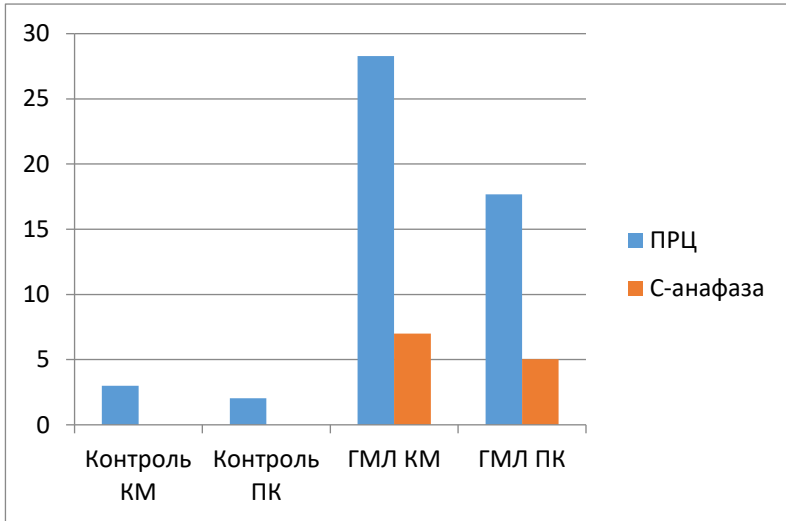


Рис. 20.6.6. Рівні ПРЦ та С-анафізи у хворих на ГМЛ в перший гострий період та в контрольній групі.

Було досліджено зв'язок між різними клінічними параметрами хворих на ГМЛ, наприклад, між рівнем гемоглобіну і числом бластів у периферійній крові – кореляції не виявлено ($r = -0,226$); між числом бластів у периферійній крові та загальним рівнем лейкоцитів у периферійній крові – кореляції не виявлено ($r = 0,325$).

Дослідження зв'язку між рівнем бластів в периферійній крові хворих на ГМЛ та рівнем ПРЦ в периферійній крові та червоному кістковому мозку показало наявність високої позитивної кореляції як між рівнем бластів в периферійній крові та рівнем ПРЦ в периферійній крові ($r = 0,995$), так і між рівнем бластів в периферійній крові і рівнем ПРЦ в червоному кістковому мозку ($r = 0,986$) (рис. 20.6.7, 20.6.8).

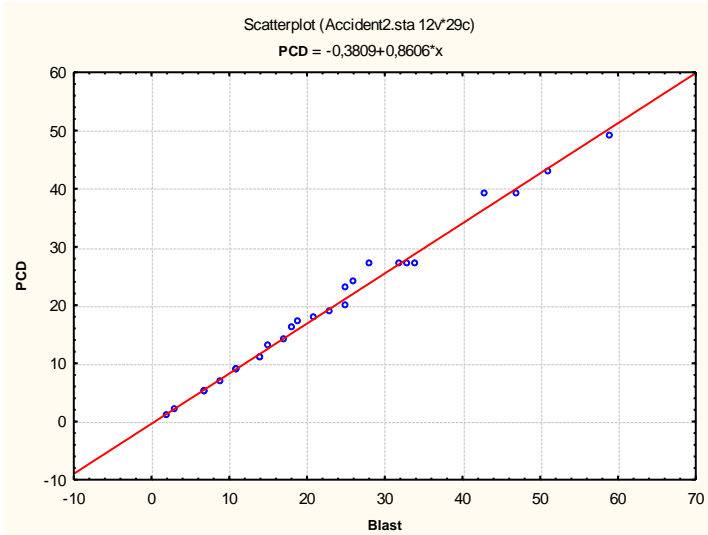


Рис. 20.6.7. Лінійна кореляція між рівнем бластів у периферійній крові та рівнем ПРЦ у периферійній крові хворих на ГМЛ ($r = 0,995$).

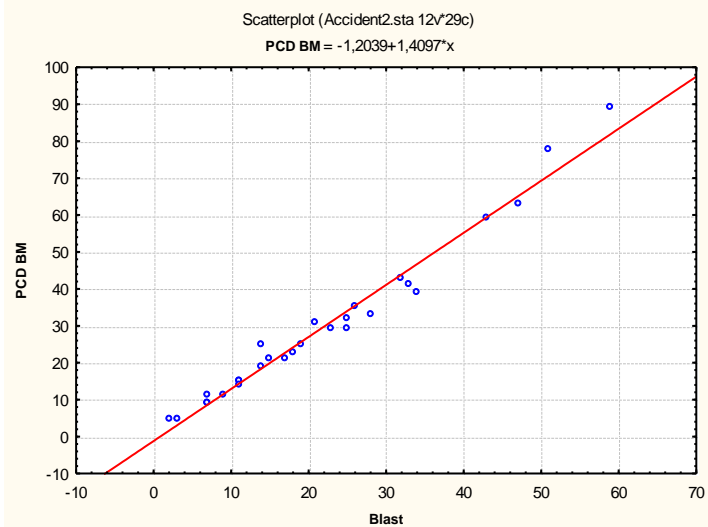


Рис. 20.6.8. Лінійна кореляція між рівнем бластів у периферійній крові та рівнем ПРЦ у кістковому мозку хворих на ГМЛ ($r = 0,986$).

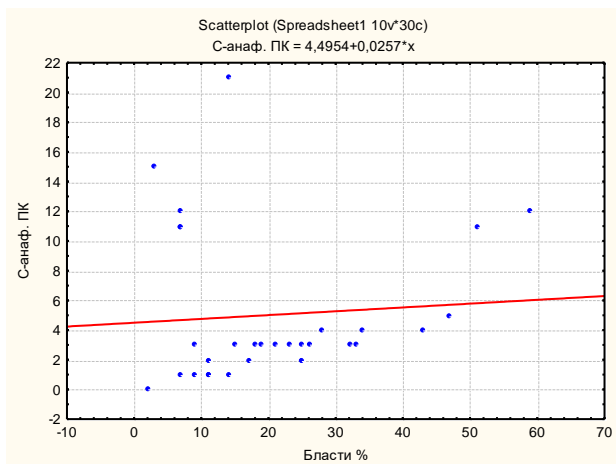


Рис. 20.6.9. Лінійна кореляція між рівнем бластів у периферійній крові та рівнем С-анафазу у периферійній крові хворих на ГМЛ ($r = 0,075$) – кореляція відсутня.

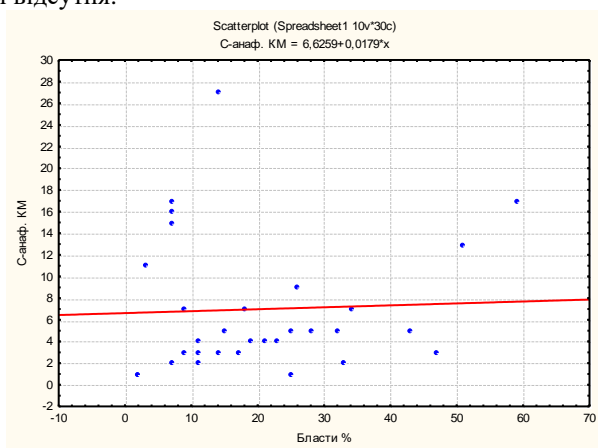


Рис. 20.6.10. Лінійна кореляція між рівнем бластів у периферійній крові та рівнем С-анафазу у червоному кістковому мозку хворих на ГМЛ ($r = 0,043$) – кореляція відсутня.

У той же час не виявлено ніякого зв'язку між рівнями бластів в периферійній крові і рівнями С-анафази в периферійній крові та червоному кістковому мозку хворих на ГМЛ (рис. 20.6.9, 20.6.10).

Ці результати аналогічні до результатів отриманих при дослідженні клітин хворих на ГЛЛ і наводять на аналогічну думку, що при ГМЛ так само як і при ГЛЛ феномен ПРЦ в більшій мірі притаманний злоякісним бластним клітинам крові і червоного кісткового мозку в більшій мірі, аніж нормальним клітинам крові. І цей феномен може бути використаний як додатковий діагностичний критерій ГМЛ. Ці результати підтверджують думку, що феномени ПРЦ та С-анафази є різними феноменами і щодо біологічної природи цих явищ, і щодо їх значення в онкогенезі ГМЛ.

У хворих на ГМЛ і в периферійній крові, і в червоному кістковому мозку були виявлені клітини (крім клітин з нормальним набором хромосом 46,XX та 46,XY), з аномальними наборами хромосом – анеуплоїдні та поліплоїдні: анеуплоїдні клітини з набором від 28 до 51 хромосоми – з надлишком або недоліком хромосом груп С, Е, G, а також поліплоїдні клітини з наборами 69, 92, 138 хромосом. Анеуплоїди та поліплоїди траплялись в периферійній крові та червоному кістковому мозку різних пацієнтів з різною частотою. Значення рівнів ПРЦ, С-анафази, анеуплоїдних та поліплоїдних клітин наведені в табл. 20.6.4.

Таблиця 20.6.4. Рівні ПРЦ, С-анафази, анеуплоїдії (Ан.), поліплоїдії (Пол.) в хворих на ГМЛ у клітинах периферійної крові.

№ з/п	Хворий	Форма ГМЛ	Бласти в ПК (%)	ПРЦ в ПК (%)	С-анафаза в ПК (%)	Ан. (%)	Пол. (%)
1	НА	M1	11	9	1	5	0
2	ПМ	M5a	14	11	21	8	1
3	СТ	M1	9	7	1	4	0
4	ПР	M7	15	13	3	10	2
5	ЛГ	M1	7	5	11	2	0
6	ДЛ	M1	21	18	3	15	3
7	ДН	M1	2	1	0	0	0
8	НН	M7	25	23	3	21	4
9	ПО	M1	47	39	5	45	5
10	ВР	M1	33	27	3	34	3
11	ТО	M1	25	20	2	13	1
12	ЛД	M5	14	11	1	7	0
13	ТП	M2	51	43	11	39	4
14	ОО	M1	32	27	3	31	2
15	АВ	M4	11	9	1	4	1
16	СК	M5a	7	5	12	0	0
17	НБ	M1	19	17	3	11	2
18	ФН	M1	23	19	3	15	2
19	ГМ	M2	17	14	2	10	1
20	ММ	M1	34	27	4	19	4
21	ПГ	M4	3	2	15	0	0
22	ВВ	M1	7	5	1	0	0
23	АО	M5	43	39	4	28	5
24	УК	M4	59	49	12	58	6
25	РЛ	M1	18	16	3	11	2
26	БЯ	M1	26	24	3	23	3
27	МС	M4	28	27	4	20	2
28	ІР	M1	11	9	2	5	0
29	НР	M1	9	6	3	1	0
30	АК	M1	7	8	11	2	1
Сер.			20,93	17,67	5,03	14,7	1,8
Std. Err.			± 2,68	± 2,31	± 0,92	± 2,7	± 0,33

Досліджено зв'язок між рівнями ПРЦ та анеуплоїдії, ПРЦ та поліплоїдії в клітинах периферійної крові хворих на ГМЛ. Було виявлено високі рівні позитивної кореляції в обох випадках: для ПРЦ та анеуплоїдії ($r = 0,961$), для ПРЦ та поліплоїдії ($r = 0,926$) (рис. 20.6.11, 20.6.12). Щодо С-анафази аналогічних зв'язків не виявлено (рис. 20.6.13, 20.6.14).

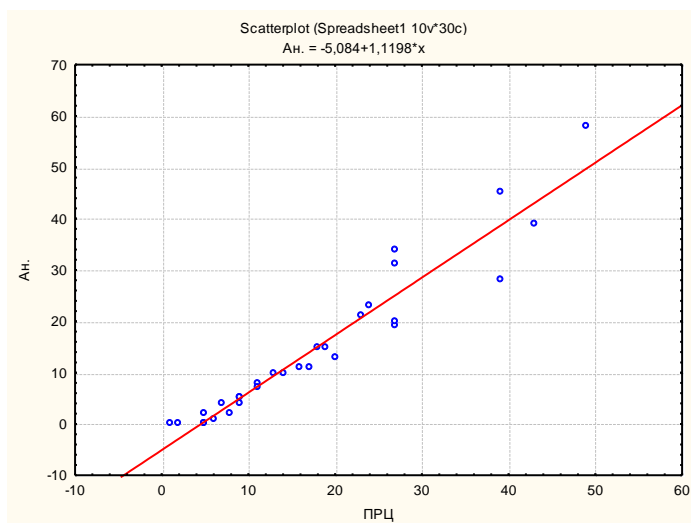


Рис. 20.6.11. Лінійна кореляція між рівнем феномена ПРЦ та рівнем анеуплоїдії в клітинах периферійної крові хворих на ГМЛ ($r = 0,961$).

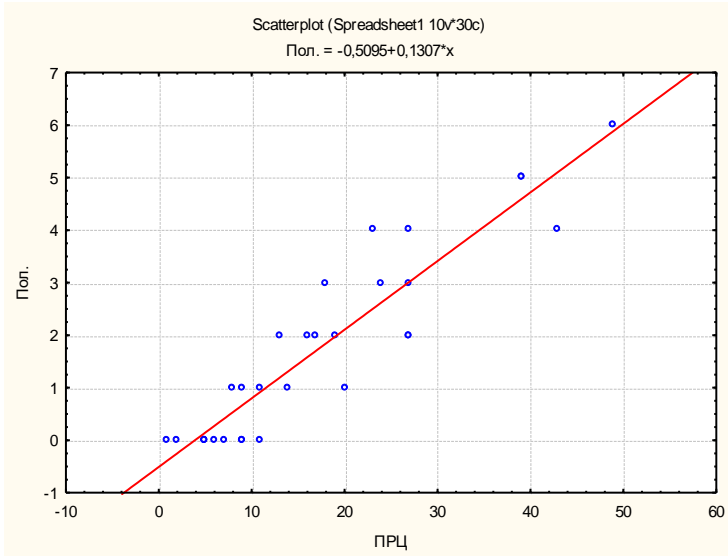


Рис. 20.6.12. Лінійна кореляція між рівнем феномена ПРЦ та рівнем поліплоїдії в клітинах периферійної крові хворих на ГМЛ ($r = 0,926$).

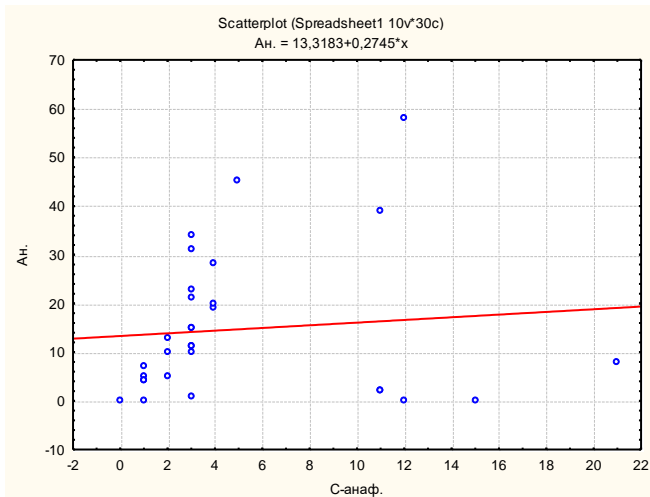


Рис. 20.6.13. Лінійна кореляція між рівнем феномена С-анафазу та рівнем анеуплоїдії в клітинах периферійної крові хворих на ГМЛ ($r = 0,094$) – кореляція відсутня.

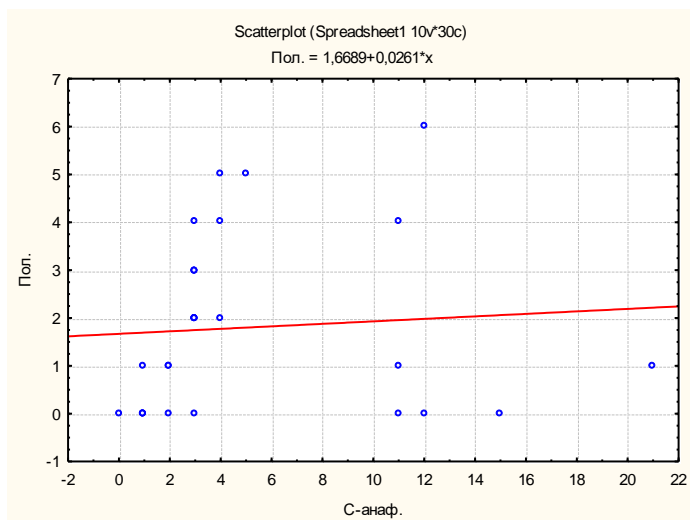


Рис. 20.6.14. Лінійна кореляція між рівнем феномена С-анафазу та рівнем поліплоїдії в клітинах периферійної крові хворих на ГМЛ ($r = 0,073$) – кореляція відсутня.

Ці результати наводять на думку, що саме феномен ПРЦ при ГМЛ (як і при ГЛЛ) є причиною виникнення анеуплоїдних та поліплоїдних клонів і в ширшому розумінні причиною нестабільності геному.

Було досліджено рівень анеуплоїдних клонів в периферійній крові хворих на ГМЛ дітей та частота ПРЦ хромосом окремих груп. Було виявлено, що частота ПРЦ окремих груп хромосом (А, В, С, D, Е, F, G) статистично достовірно відрізняються між собою. Найвищими показниками ПРЦ відрізнялись хромосоми груп G та А (частота ПРЦ становила $6,57 \pm 0,98$ та $5,53 \pm 0,77$ відповідно). Найнижчими показниками ПРЦ відрізнялися хромосоми групи В - $0,35 \pm 0,14$. Частоти ПРЦ різних груп хромосом статистично достовірно відрізнялися (табл. 20.6.5, рис. 3.22).

Таблиця 20.6.5. ПРЦ у клітинах периферійної крові різних груп хромосом у хворих на ГМЛ. Показана кількість випадків ПРЦ на хромосомних препаратах для різних груп хромосом – кількість виявлених хромосом з ПРЦ певної групи на 100 мітозів.

№ з/п	Хворий	ПРЦ в ПК (%)	A	B	C	D	E	F	G
1	НА	9	2	0	3	0	1	1	2
2	ПМ	11	5	0	2	1	0	2	1
3	СТ	7	3	0	4	0	1	2	1
4	ПР	13	6	1	5	0	0	3	1
5	ЛГ	5	1	0	4	0	1	1	1
6	ДЛ	18	12	1	3	2	1	3	0
7	ДН	1	1	0	0	0	0	0	0
8	НН	23	9	0	7	1	4	2	4
9	ПО	39	15	0	11	2	3	3	5
10	ВР	27	10	1	4	2	5	7	10
11	ТО	20	5	0	0	0	0	11	15
12	ЛД	11	4	0	1	1	1	4	7
13	ТП	43	12	1	4	7	9	4	11
14	ОО	27	4	0	7	7	4	9	12
15	АВ	9	2	0	1	0	2	5	6
16	СК	5	0	0	0	0	1	4	1
17	НБ	17	5	0	0	0	0	15	3
18	ФН	19	3	0	0	0	0	9	8
19	ГМ	14	6	0	1	1	1	5	5
20	ММ	27	7	1	2	1	7	9	11
21	ПГ	2	0	0	0	0	0	0	2
22	ВВ	5	0	0	0	0	0	0	5
23	АО	39	7	2	5	6	4	5	15
24	УК	49	11	3	4	7	9	9	17
25	РЛ	16	8	0	1	3	0	5	10
26	БЯ	24	9	0	0	0	3	11	9
27	МС	27	7	0	1	0	2	9	15
28	ІР	9	1	0	0	0	0	2	7
29	НР	6	0	0	0	0	0	3	10
30	АК	8	1	0	0	0	0	1	9
Сеп.		17,67	5,53	0,35	2,50	1,46	2,10	5,00	6,57
Std. Err.		± 2,31	±0,77	±0,14	±0,52	±0,44	±0,5	±0,74	±0,98

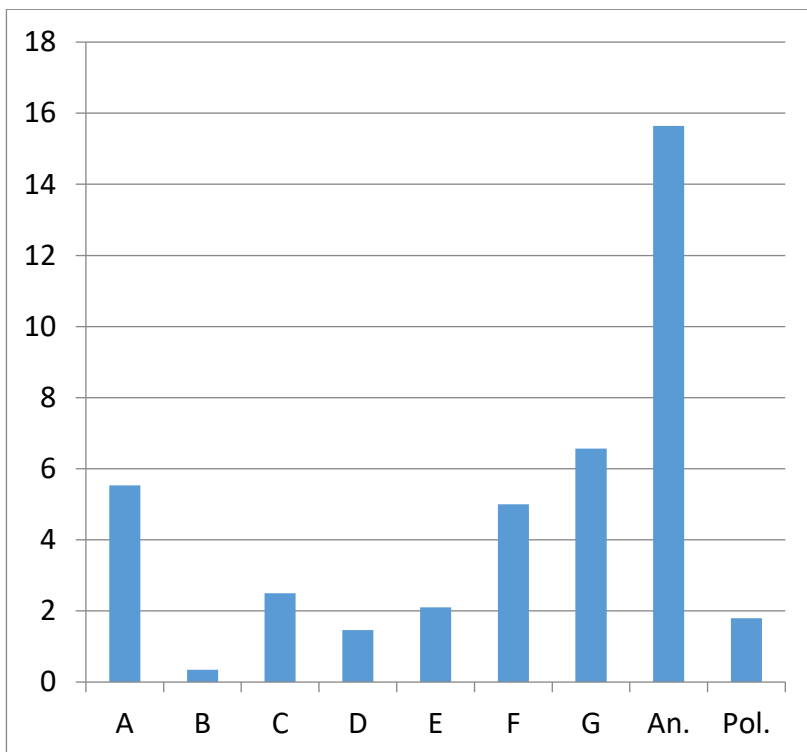


Рис. 20.6.15. Частота ПРЦ різних груп хромосом та частота анеуплоїдних та поліплоїдних клонів у периферійній крові хворих на ГМЛ.

Дослідження показали, що рівні ПРЦ хромосом різних груп суттєво відрізняються при ГМЛ та при ГЛЛ (рис. 20.6.16), що теж може бути використано як додатковий діагностичний критерій.

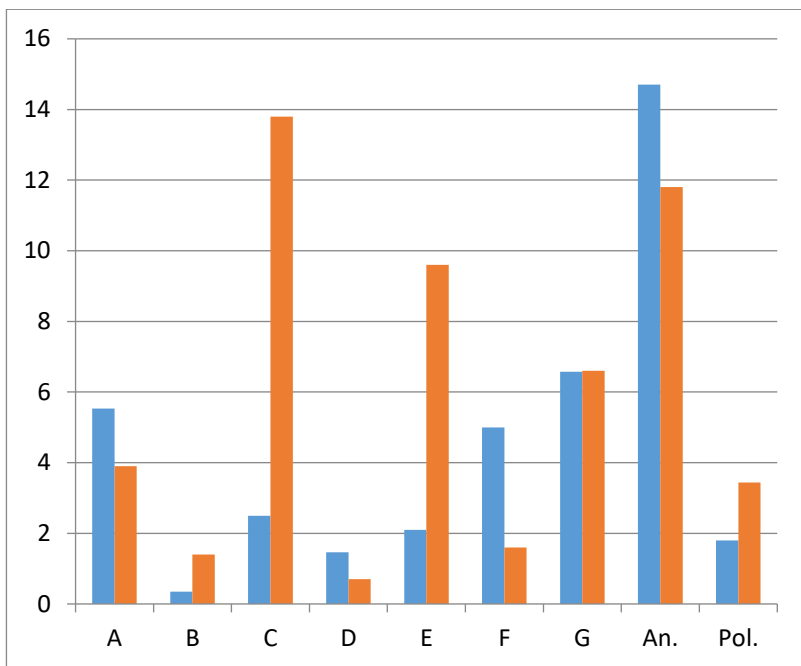


Рис. 20.6.16. Порівняльний аналіз рівня ПРЦ різних груп хромосом, анеуплоїдії (An.) та поліплоїдії (Pol.) при ГМЛІ (1) та ГЛЛ (2) (%).

20.7. Феномени передчасного розділення центромер та С-анафази при негоджкінській лімфомі

Досліджено 15 пацієнтів віком від 2 до 17 років хворих на негоджкінську лімфому (НГЛ) до початку лікування в першій гострій період.

У результаті проведених досліджень 15 пацієнтів хворих на НГЛ було виявлено, що серед 15 досліджених хворих 12 дітей були чоловічої статі і тільки 3 хворих – жіночої статі. Співвідношення 4 : 1 (табл. 20.7.1, рис. 20.7.1). Це корелює з даними інших дослідників про те, що НХЛ частіше трапляється у людей чоловічої статі, але цей показник в наших дослідженнях значно вищий ніж той, що наводиться у різних літературних джерелах.

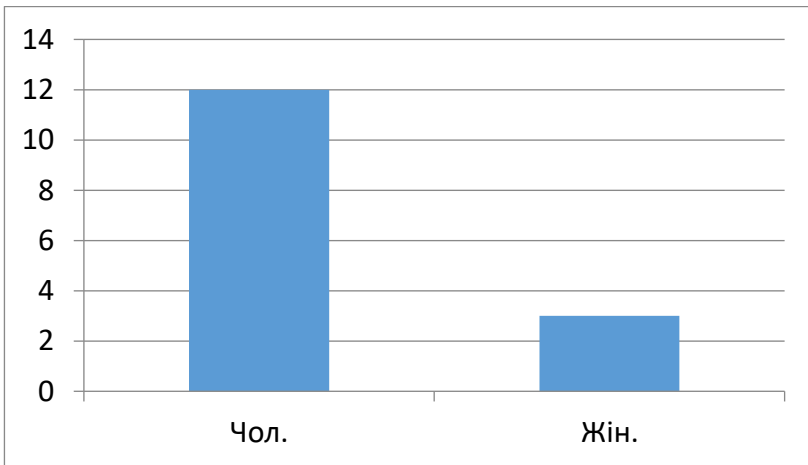


Рис. 20.7.1. Співвідношення числа виявлених хворих на НГЛ різної статі. Показана кількість досліджених хворих.

За віковими групами досліджені хворі розподіляються на такі категорії:

1. Від 0 до 1 року – 0 пацієнти.
2. Від 2 до 4 років – 1 пацієнтів.
3. Від 5 до 7 років – 2 пацієнт.
4. Від 8 до 10 років – 3 пацієнтів.
5. Від 11 до 14 років – 8 пацієнтів.
6. Від 14 до 17 років – 1 пацієнт.

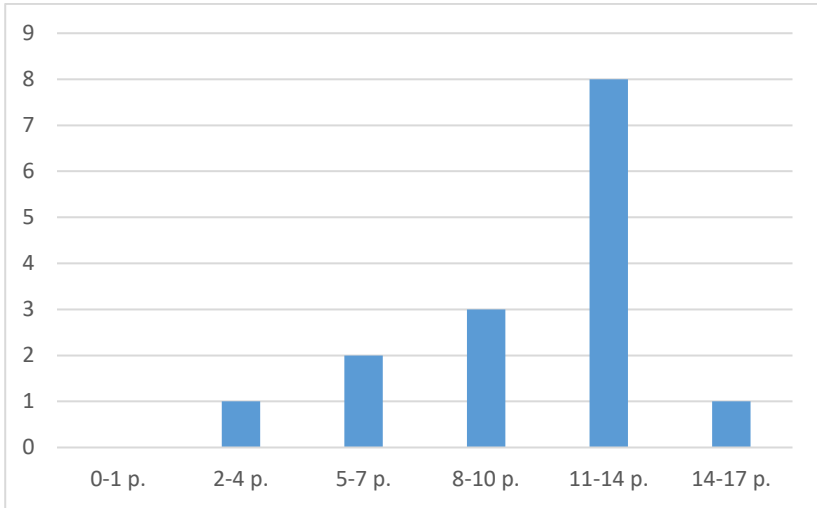


Рис. 20.7.2. Розподіл за віковими групами досліджених пацієнтів з НГЛ.

Було зафіксовано у хворих на НГЛ високі рівні ПРЦ та С-анафази, які статистично достовірно відрізняються від показників цих феноменів у контрольній групі – нормальних здорових дітей та донорів, що проходили обстеження. У хворих на НГЛ зафіксовано аномально високі значення рівня С-анафази як в культурі клітин периферійної крові, так і в кістковому мозку – ці значення досягали 51,27 % клітин периферійної крові і 66,47 % клітин кісткового мозку. Це більше ніж у 5 – 6 разів

перевищувало значення цього показника у хворих на інші досліджувані онкологічні захворювання – гострий лімфобластний лейкоз, гострий мієлобластний лейкоз (табл. 20.7.3, рис. 20.7.2). Феномен С-анафази взагалі не зустрічався в контрольній групі. Ці факти дозволяють пропонувати визначення С-анафази як додатковий діагностичний критерій негоджкінської лімфоми.

Таблиця 20.7.3. Частота ПРЦ та С-анафази при різних патологіях крові та в контрольній групі.

№ з/п	Діагноз	ПРЦ		С-анафаза	
		ПК	КМ	ПК	КМ
1.	Контроль	1,7 ± 0,3	3,0 ± 0,3	0	0
2.	ГМЛ	17,67 ± 2,31	28,27 ± 3,84	5,03 ± 0,92	7,0 ± 1,12
3.	ГЛЛ	29,16 ± 3,48	31,70 ± 3,59	7,63 ± 1,5	9,58 ± 1,5
4.	НХЛ	6,13 ± 1,25	6,87 ± 0,74	51,27 ± 1,99	66,47 ± 2,19

Досліджена кореляція між різними клінічними параметрами хворих на НХЛ (в тому числі рівнем лейкоцитів, рівнем гемоглобіну та ін.) та феноменами ПРЦ та С-анафази. Кореляції між цими показниками не виявлено. Виявлена лише кореляція між рівнем ПРЦ у ПК та рівнем лейкоцитів у периферійній крові ($r = 0,849$). Але ця кореляція – як лінійна так і не лінійна наявна за рахунок процесу лейкемізації у одного з обстежених пацієнтів. Очевидно, феномен ПРЦ притаманний в більшій мірі злякисним клітинам, які потрапляють у ПК та КМ при лейкемізації.

Досліджена кореляція між рівнем ПРЦ в кістковому мозку (КМ) та цим показником у периферійній крові: $r = -0,193$ – кореляція відсутня.

Досліджена кореляція між рівнем С-анафази у ПК та КМ: $r = 0,306$ – кореляція відсутня. Також не була виявлена кореляція між рівнями ПРЦ та С-анафази у периферійній крові: $r = 0,314$. Ці факти наводять на думку

про те, що ПРЦ та С-анафаза принципово різні явища з різними механізмами та біологічним значенням, і що у хворих на НХЛ відбуваються різні процеси, пов'язані з цими феноменами у ПК та в КМ.

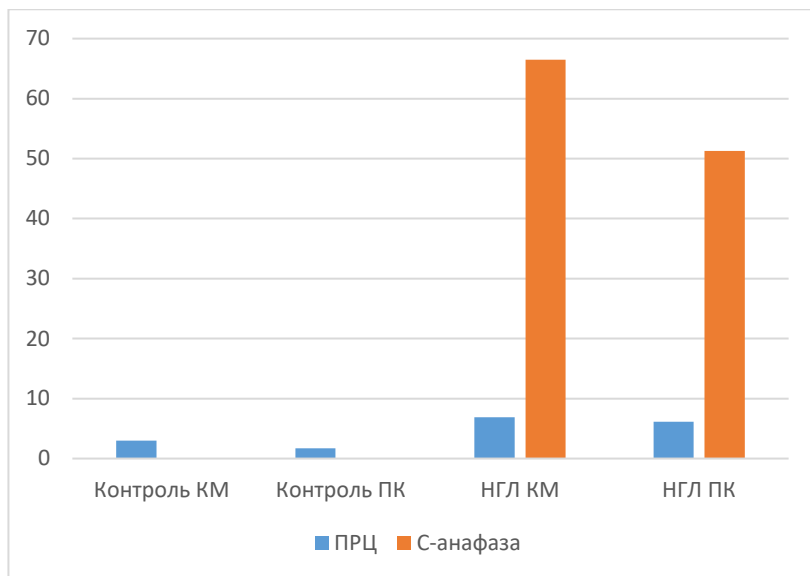


Рис. 20.7.3. Рівні ПРЦ та С-анафазу у хворих на НГЛ та в контрольній групі.

Таблиця 20.7.1. Частота феноменів ПРЦ та С-анафазу у периферійній крові та кістковому мозку хворих на неходжкінські лімфоми (НХЛ) дітей.

№ з/п	Хворий	Стать	Форма НХЛ	Бласти в ПК (%)	ПРЦ (%)		С-анафаза (%)	
					ПК	КМ	ПК	КМ
1	БЛ	♂	В	0	7	9	51	68
2	ТЕ	♂	В	0	12	8	42	63
3	ПА	♂	В	0	3	5	35	72
4	МА	♂	В	81	21	2	65	84

5	ТО	♂	В	0	5	8	52	61
6	ЧЛ	♂	В	0	5	7	49	55
7	ДД	♀	В	0	9	11	54	68
8	КТ	♂	В	0	3	7	59	72
9	РВ	♂	В	0	4	5	41	54
10	ЛО	♂	В	0	2	7	59	51
11	ТВ	♀	В	0	4	12	48	69
12	ЛВ	♂	В	0	5	7	55	72
13	КН	♀	В	0	4	3	57	68
14	МК	♂	В	0	5	9	50	69
15	ПР	♂	В	0	3	3	52	71
Сер.				5,4	6,13	6,87	51,27	66,47
Std. Err.					± 1,25	± 0,74	± 1,99	± 2,19

Таблиця 20.7.2. Клінічні показники досліджених хворих на негоджкінські лімфоми.

№ з/п	Хворий	Стать	Форма НХЛ	Нв. (г/л)	Leu. (тис./мм ³)	Тг. (тис./мм ³)
1	БЛ	♂	В	89	10	156
2	ТЕ	♂	В	91	8	192
3	ПА	♂	В	73	6	240
4	МА	♂	В	69	54	94
5	ТО	♂	В	98	4	140
6	ЧЛ	♂	В	80	7	125
7	ДД	♀	В	91	11	247
8	КТ	♂	В	75	9	155
9	РВ	♂	В	76	7	189
10	ЛО	♂	В	90	5	278
11	ТВ	♀	В	96	8	290
12	ЛВ	♂	В	85	10	248
13	КН	♀	В	71	9	201
14	МК	♂	В	82	12	110
15	ПР	♂	В	101	13	290
Сер.				84,47	11,53	197,0
Std. Err.				± 2,64	± 3,10	± 17,04

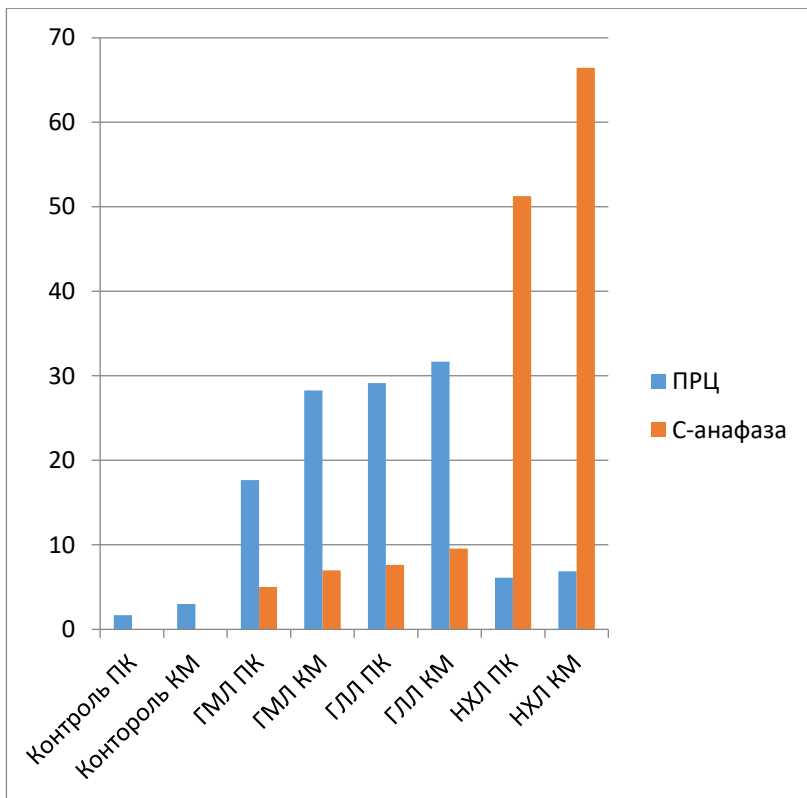


Рис. 20.7.4. Середній рівень ПРЦ та С-анафази у хворих на ГМЛ, ГЛЛ, НГЛ в перший гострий період до початку лікування в периферійній крові, в кістковому мозку та в контрольній групі.

20.8. Феномени передчасного розділення центромер та С-анафази при ідіопатичній гіпопластичній анемії

Крім онкологічних захворювань, пов'язаних з системою кровотворення, було досліджено феномени ПРЦ та С-анафази в іншій групі гематологічних хворих – пацієнтів, яким було поставлено діагноз ідіопатична гіпопластична анемія (ІГПА). Цю патологію можна розглядати як патологію прямо протилежну до лейкозів та лімфом – якщо при лейкозах відбувається аномальна активна проліферація стовбурових клітин червоного кісткового мозку, то тут має місце протилежний процес – за нез'ясованих причин стовбурові клітини червоного кісткового мозку перестають ділитися і гинуть. Червоний кістковий мозок деградує, гіпопластична анемія перетворюється в апластичну, що закінчується летально. Постає питання, як поводять себе ці два феномени – ПРЦ та С-анафаза в цій популяції клітин з суттєво заниженою від норми проліферацією. Не в усіх з досліджених пацієнтів вдалося простежити подальший перебіг захворювання, але як мінімум у 3 пацієнтів ця патологія перетворилася в ідіопатичну апластичну анемію, і перебіг захворювання завершився летально.

У результаті проведених досліджень було отримано і проаналізовано наступні клінічні і цитогенетичні показники 17 пацієнтів з діагнозом ідіопатичної форми гіпопластичної анемії: рівень тромбоцитів, лейкоцитів, гемоглобіну, поліплоїдії, С-анафази, передчасного розділення центромер (ПРЦ) культивованих клітин периферійної крові. Отримані результати наведені в таблиці 20.8.1.

Крім хворих були отримані аналогічні результати контрольної групи. Середні показники досліджуваних параметрів наведені в таблиці 20.8.2.

Таблиця 20.7.1. Феномени ПРЦ, С-анафази, рівні поліплоїдії та основні клінічні показники у досліджених хворих на ідіопатичну гіпопластичну анемію дітей до початку лікування.

№ з/п	Пацієнт	Стать	ПРЦ (%)	С-анаф. (%)	Пол. (%)	Нь. (г/л)	Leu. (тис. /мм ³)	Гр. (тис. /мм ³)
1.	Ф. Я.	♀	12	1	1	71	2,6	89
2.	Л. А.	♂	24	3	2	67	1,9	30
3.	К. Н.	♀	47	9	3	61	1,3	36
4.	Х. Р.	♂	31	0	0	64	1,4	41
5.	Г. Г.	♀	20	10	1	69	2,3	55
6.	Г. А.	♂	10	1	0	81	2,7	84
7.	Б. А.	♂	6	1	0	88	3,4	87
8.	Р. М.	♂	11	1	0	79	2,3	80
9.	П. М.	♀	3	0	0	99	3,8	95
10.	Ж. І.	♀	9	1	0	91	3,2	91
11.	Б. А.	♂	10	2	1	77	2,2	90
12.	Л. О.	♀	14	0	0	75	3,0	88
13.	С. М.	♂	10	1	2	74	2,9	94
14.	Т. І.	♀	85	16	3	55	0,8	29
15.	Т. О.	♀	7	1	0	85	2,8	90
16.	Д. І.	♂	54	9	2	59	0,9	21
17.	М. Н.	♂	13	2	1	73	2,8	80
Сер.			21,53	3,41	0,941	74,58	2,37	69,41
Std. Err.			± 5,25	± 1,12	± 0,26	± 2,87	± 0,21	± 6,56

Було виявлено статистично достовірну відмінність між групою хворих на ІГПА та контрольною групою по досліджених параметрах.

Розподіл по статі не виявив статистично відмінної частоти захворювання на ідіопатичну форму ГПА між хворими дітьми різної статі. Було виявлено 9 пацієнтів чоловічої статі і 8 пацієнтів жіночої статі. Для висновків щодо зв'язку зі статтю необхідна більша вибірка пацієнтів (рис. 20.8.1).

Таблиця 20.8.2. Середні показники цитогенетичних та клінічних показників у хворих на ідіопатичну гіпопластичну анемію (ІГПА) та у контрольній групі.

№ з/п	Показник	ІГПА	Контроль	Норма
1.	ПРЦ (%)	21,53 ± 5,25	1,7 ± 0,3	0 - 3
2.	С-анаф. (%)	3,41 ± 1,12	0,0	0
3.	Поліплоїдія (%)	0,941 ± 0,26	0,0	0
4.	НЬ. (г/л)	74,58 ± 2,87	134,27 ± 4,03	110 - 120
5.	Leu. (тис./мм ³)	2,37 ± 0,21	5,03 ± 1,45	4,0 - 9,0
6.	Тг. (тис./мм ³)	69,41 ± 6,56	320,76 ± 9,11	110 - 310

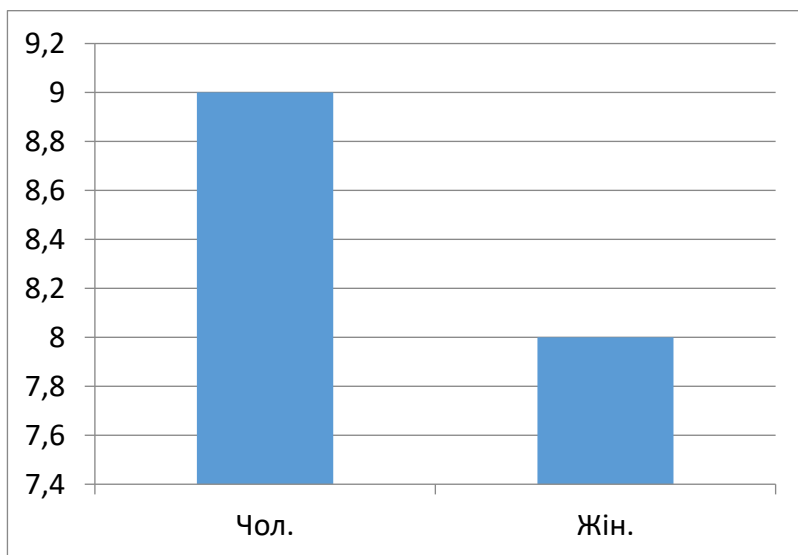


Рис. 20.8.1. Кількість пацієнтів різної статі серед досліджених хворих на ідіопатичну гіпопластичну анемію дітей.

За віковими групами досліджені пацієнти ділились на наступні вікові категорії:

1. Від 0 до 1 року – 0 пацієнти.

2. Від 2 до 4 років – 1 пацієнтів.
3. Від 5 до 7 років – 2 пацієнт.
4. Від 8 до 10 років – 6 пацієнтів.
5. Від 11 до 14 років – 8 пацієнтів.

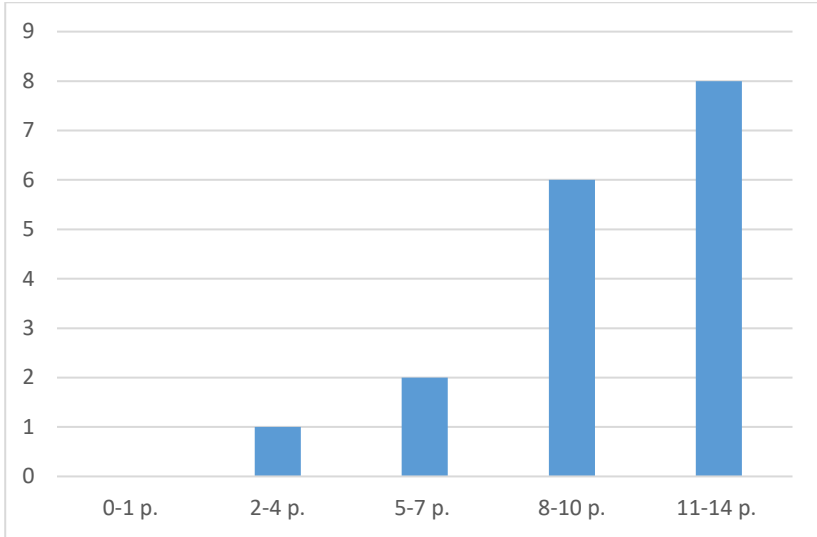


Рис. 20.8.2. Розподіл досліджених пацієнтів хворих на ІГПА за віковими групами.

У хворих на ІГПА було досліджено зв'язок між феноменами ПРЦ та С-анафази з різними клінічними показниками. Кореляційний аналіз показав, що між цілою низкою параметрів групи досліджених пацієнтів з ІГПА є високий рівень кореляції. Зокрема, виявлені високі рівні негативної лінійної кореляції між рівнем ПРЦ та гемоглобіну ($\rho = -0,808$), лейкоцитів та ПРЦ ($\rho = -0,873$), тромбоцитів та ПРЦ ($\rho = -0,839$) (рис. 20.8.6 – 20.8.20). Була виявлена як лінійна, так і не лінійна (поліноміальна) кореляція між цими параметрами. Це наводить на думку,

що феномен ПРЦ не є культуральним артефактом, а пов'язаний з перебігом захворювання, є проявом певних патологічних процесів на клітинному рівні і є додатковим діагностичним параметром перебігу низку захворювань, зокрема, ІГПА.

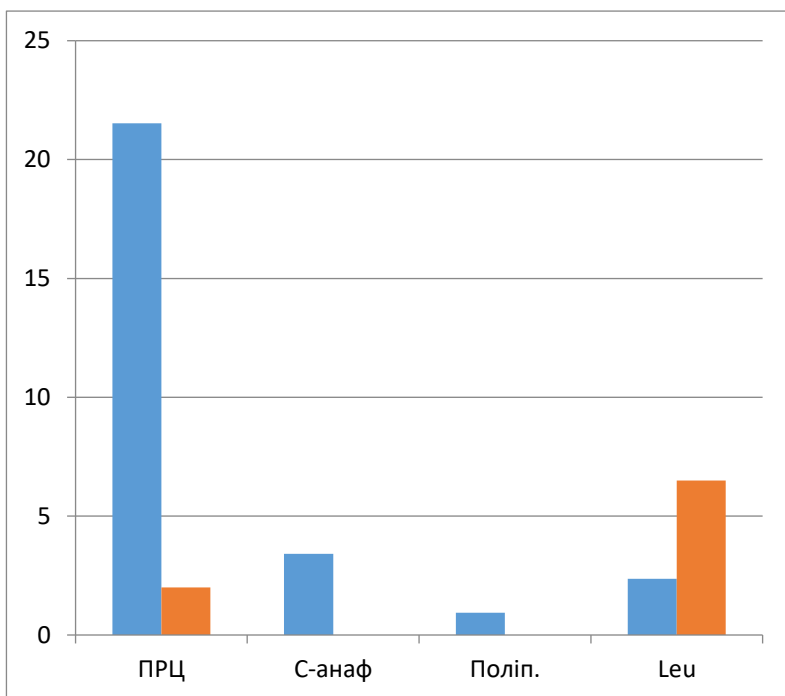


Рис. 20.8.3. Середні показники цитогенетичних та клінічних маркерів у досліджених хворих на ідіопатичну гіпопластичну анемію та середні показники контрольної групи.

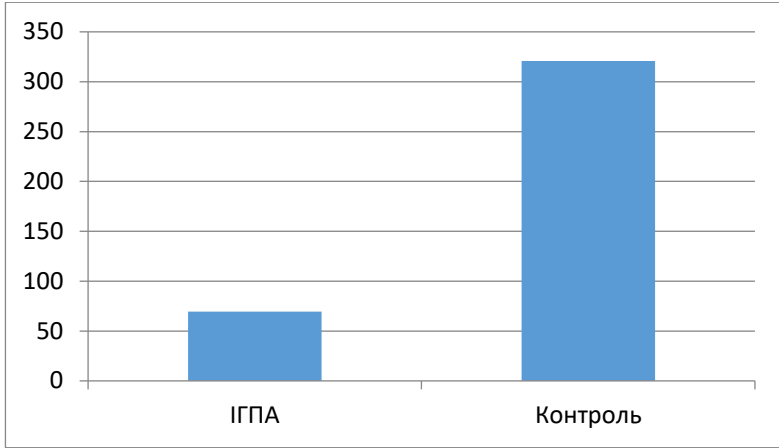


Рис. 20.8.4. Середній рівень тромбоцитів в периферійній крові досліджених хворих на ІГПА та в контрольній групі.

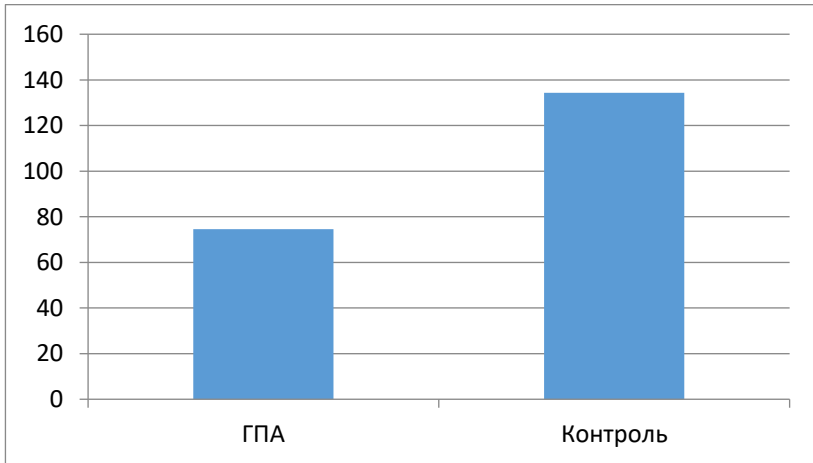


Рис. 20.8.5. Середній рівень гемоглобіну в периферійній крові досліджених хворих на ІГПА та в контрольній групі.

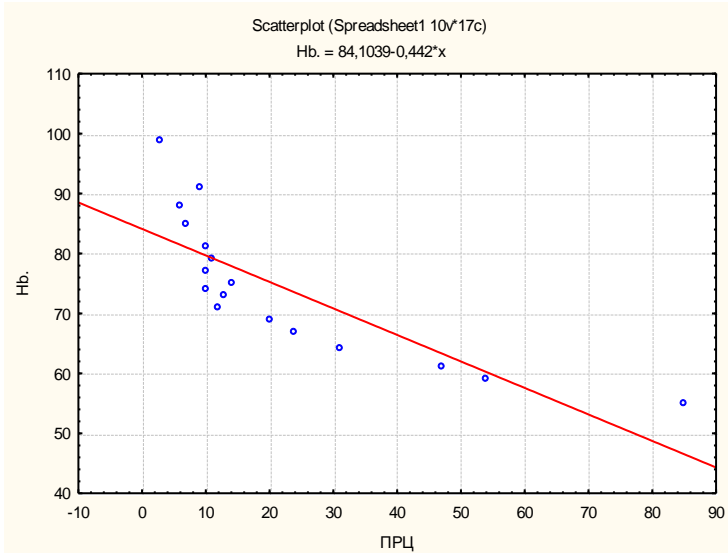


Рис. 20.8.6. Лінійна кореляція між рівнем ПРЦ та рівнем гемоглобіну у досліджених хворих на ІГПА ($r = -0,808$).

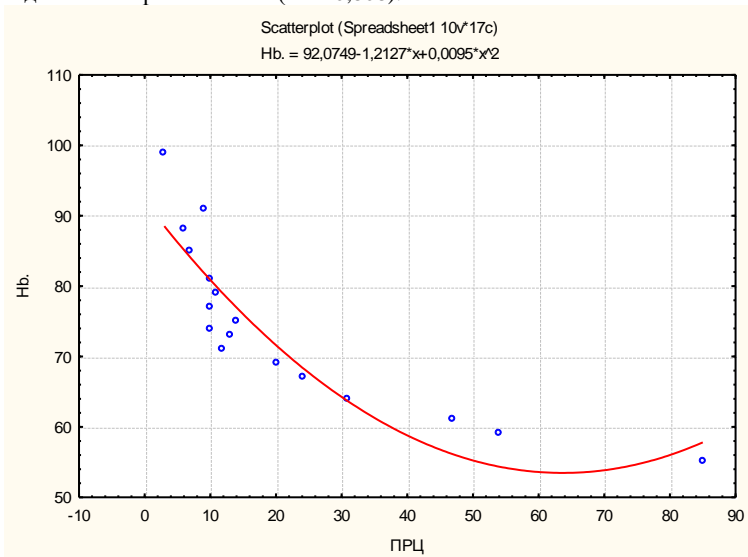


Рис. 20.8.7. Нелінійна (поліноміальна) кореляція між рівнем ПРЦ та рівнем гемоглобіну у досліджених хворих на ІГПА.

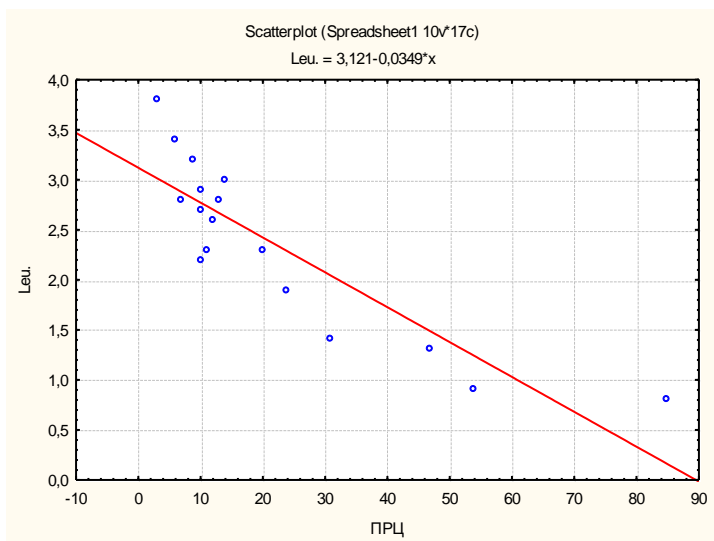


Рис. 20.8.8. Лінійна кореляція між рівнем ПРЦ та рівнем лейкоцитів у досліджених хворих на ІГПА ($r = -0,873$).

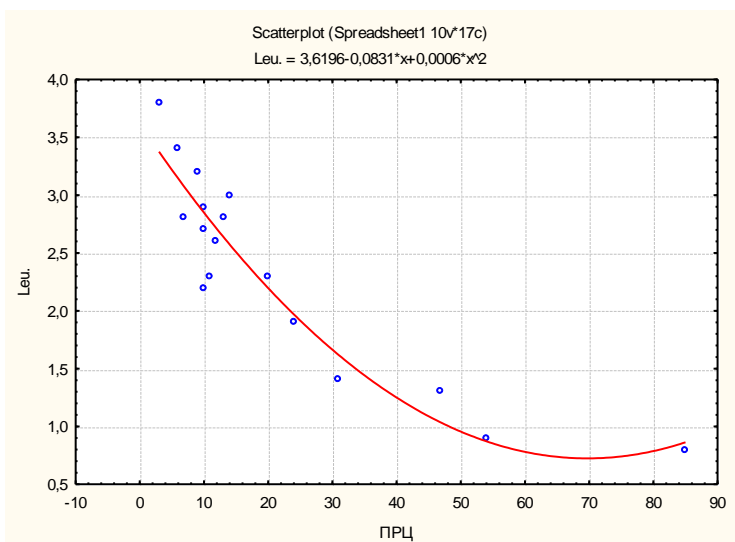


Рис. 20.8.8. Нелінійна (поліноміальна) кореляція між рівнем ПРЦ та рівнем лейкоцитів у периферійній крові у досліджених хворих на ІГПА.

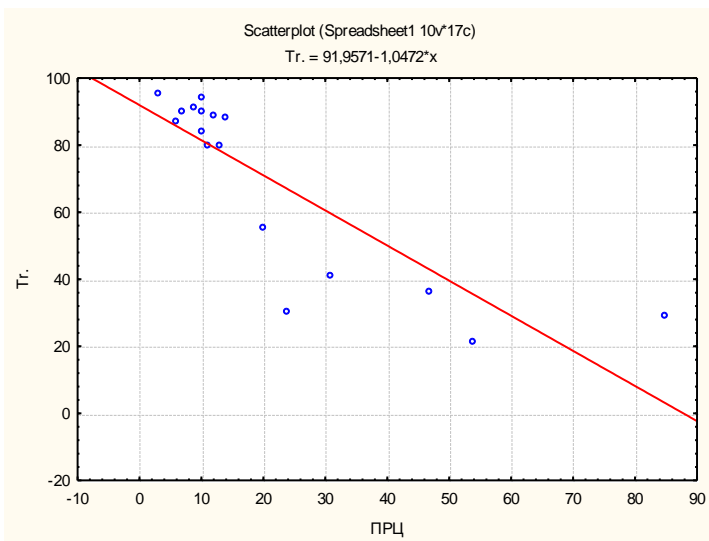


Рис. 20.8.9. Лінійна кореляція між рівнем ПРЦ у периферійній крові та рівнем тромбоцитів у досліджених хворих на ІГПА ($r = -0,839$).

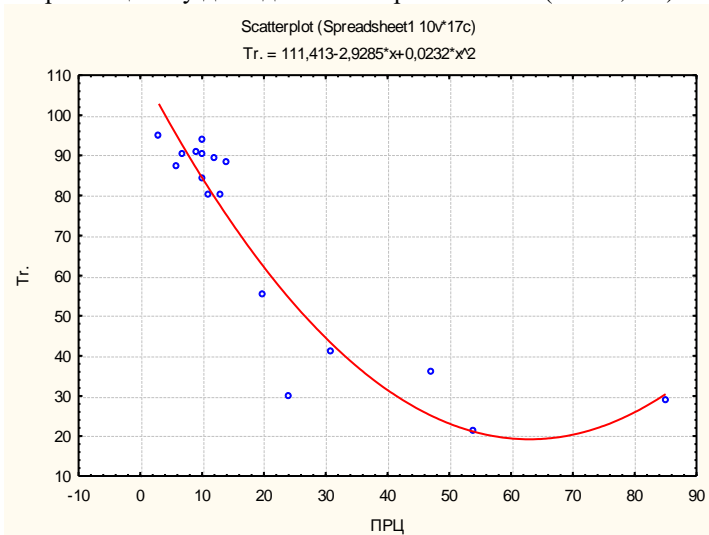


Рис. 20.8.10. Нелінійна (поліноміальна) кореляція між рівнем ПРЦ у периферійній крові та рівнем тромбоцитів у досліджених хворих на ІГПА.

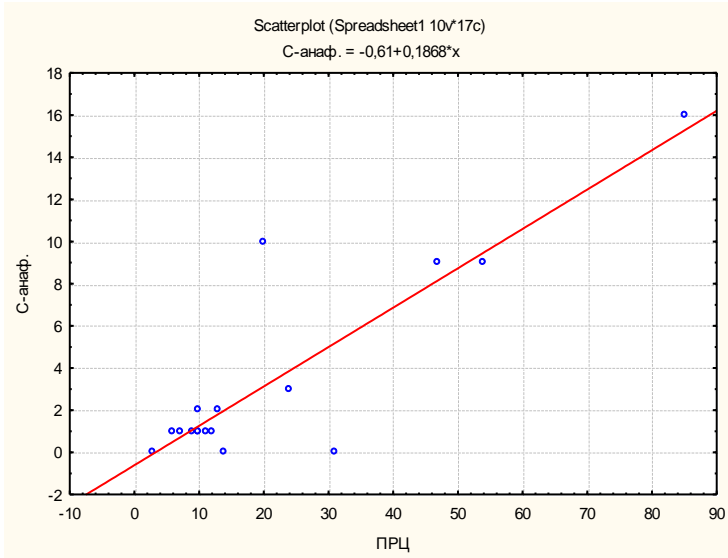


Рис. 20.8.11. Лінійна кореляція між рівнем ПРЦ та С-анафазу у периферійній крові у досліджених хворих на ІГПА ($r = 0,873$).

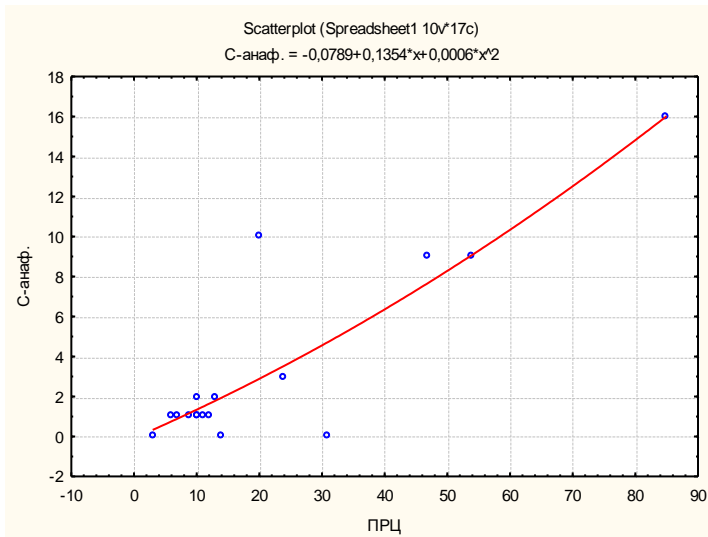


Рис. 20.8.12. Нелінійна (поліноміальна) кореляція між рівнем ПРЦ та С-анафазу у периферійній крові у досліджених хворих на ІГПА.

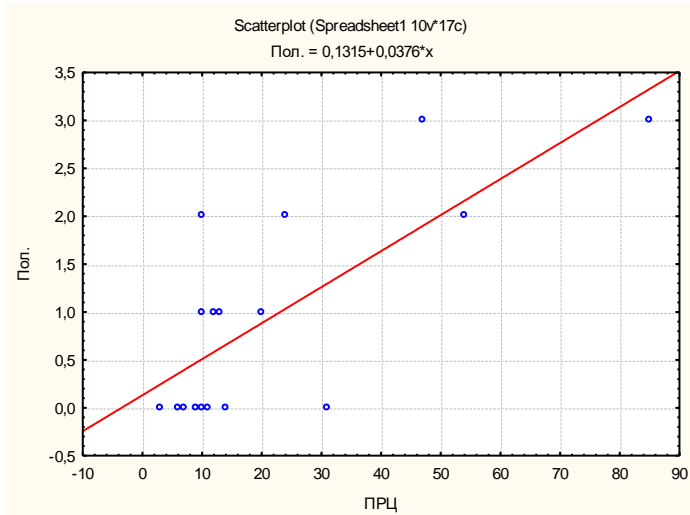


Рис. 20.8.13. Лінійна кореляція між рівнем ПРЦ та поліплоїдії у клітинах периферійної крові у досліджених хворих на ІГПА ($r = 0,749$).

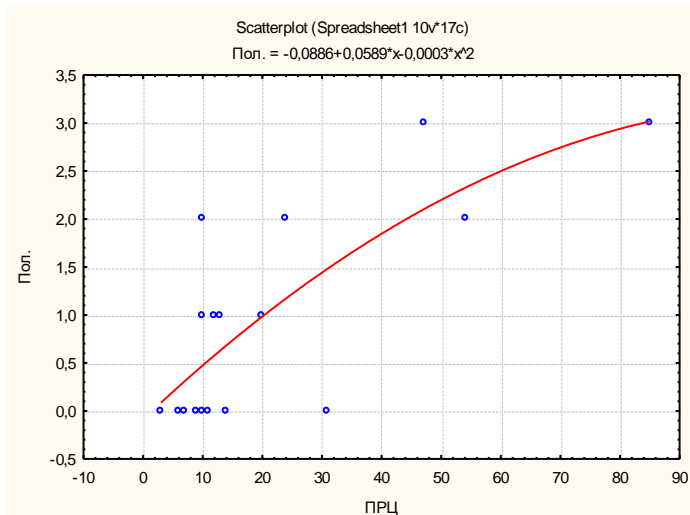


Рис. 20.8.14. Нелінійна (поліноміальна) кореляція між рівнем ПРЦ та поліплоїдії у клітинах периферійної крові у досліджених хворих на ІГПА.

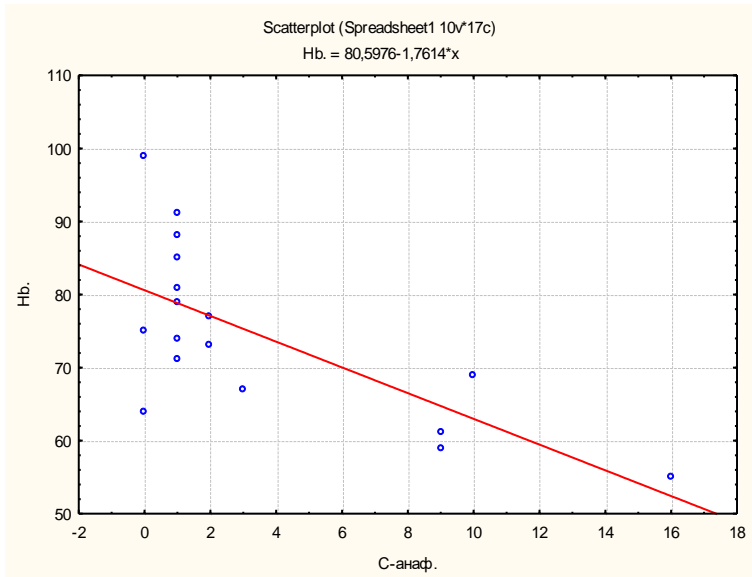


Рис. 20.8.15. Лінійна кореляція між рівнем С-анафаз та гемоглобіну у клітинах периферійної крові у досліджених хворих на ІГПА ($r = -0,689$).

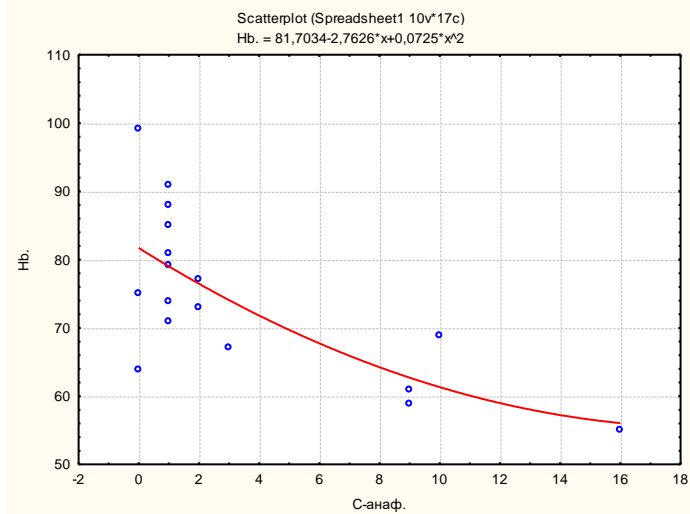


Рис. 20.8.16. Нелінійна (поліноміальна) кореляція між рівнем С-анафаз та гемоглобіну у клітинах периферійної крові у досліджених хворих на ІГПА.

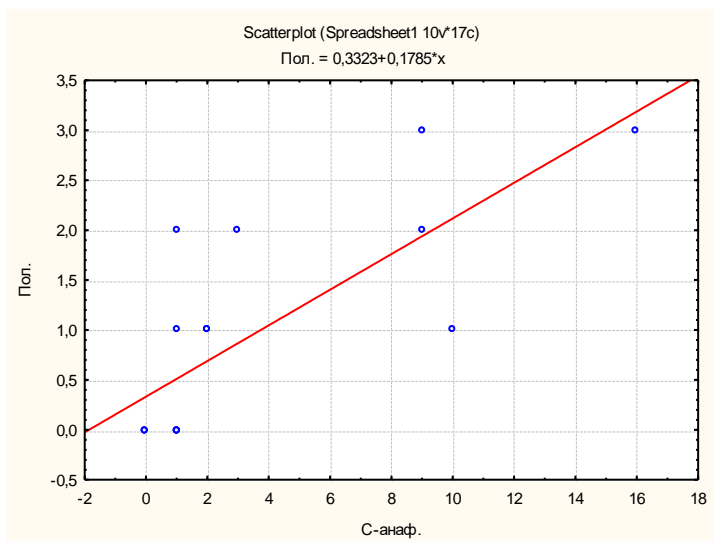


Рис. 20.8.17. Лінійна кореляція між рівнями С-анафази та поліплоїдії у клітинах периферійної крові у досліджених хворих на ІГПА ($r = 0,761$).

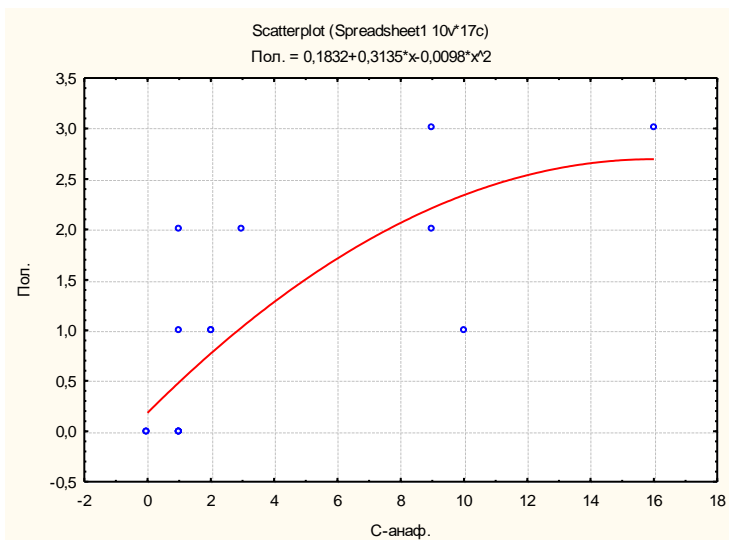


Рис. 20.8.18. Нелінійна (поліноміальна) кореляція між рівнями С-анафази та поліплоїдії у клітинах периферійної крові у досліджених хворих на ІГПА.

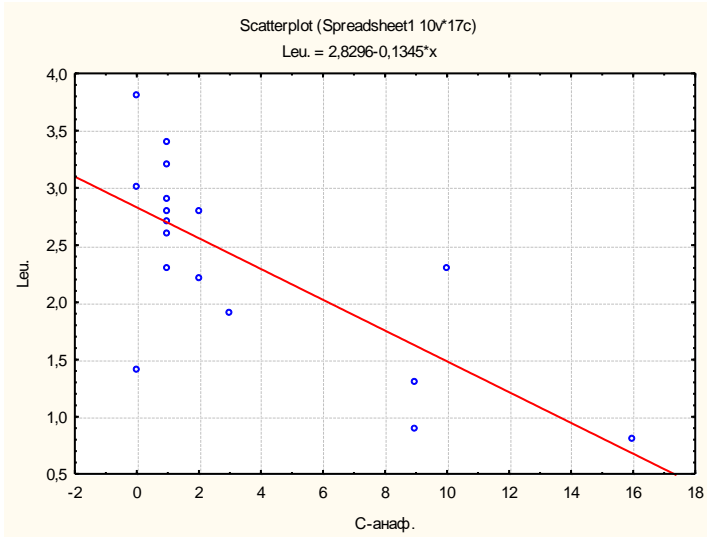


Рис. 20.8.19. Лінійна кореляція між рівнями С-анафази та лейкоцитів у периферійній крові у досліджених хворих на ІГПА ($r = -0,721$).

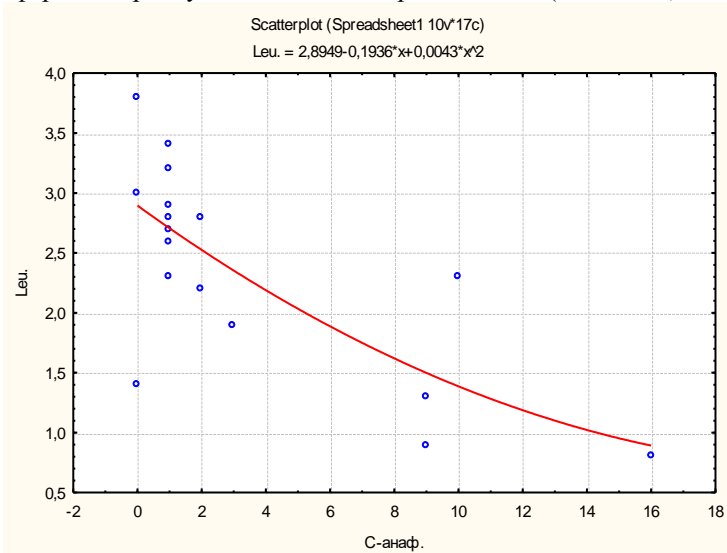


Рис. 20.8.20. Нелінійна (поліноміальна) кореляція між рівнями С-анафази та лейкоцитів у периферійній крові у досліджених хворих на ІГПА.

Як бачимо із представлених даних у хворих на ІГПА низка клінічних і цитогенетичних параметрів тісно пов'язані між собою. Це свідчить з одного боку про невідповідність феноменів ПРЦ та С-анафази, а з іншого – про зв'язок досліджених феноменів з регуляторними механізмами проліферації клітин та апоптозу.

20.9. Центромера і досі в сутінках. Роль центромери в патологічних процесах клітинного рівня – більше питань, ніж відповідей

Як бачимо з вищевикладеного, вперше здійснено комплексне дослідження явищ ПРЦ та С-анафази на великій вибірці при низці патологій – в першу чергу онкологічних патологій – при ГЛЛ, ГМЛ та НГЛ.

У результаті проведених досліджень виявлено низку закономірностей і залежностей – найважливіші з яких наступні: феномен ПРЦ притаманний в більшій мірі злоякісним онкотрансформованим клітинам або клітинам з порушеними проліферацією та апоптозом, феномен ПРЦ є причиною нестабільності геному при низці патологій, в першу чергу, онкологічних, феномени ПРЦ та С-анафази є додатковими діагностичними критеріями при низці різних патологій, феномени ПРЦ та С-анафази є прогностичними факторами, що дозволяють передбачати перебіг таких захворювань як ГЛЛ, феномен С-анафази якимось чином пов'язаний з явищем апоптозу.

Дані, отримані нами на відносно великих вибірках, підтверджують дані літератури, що в свій час були зроблені на малих вибірках, зокрема, при дослідженні ГМЛ. Високі рівні ПРЦ при гострих лейкозах зафіксували Галло Дж. (Gallo J.) та співавтори [108], Літтефілд Л. (Littfield L.) та співавтори [169], Шірайші Й. (Shiraishi Y.)

та співавтори [255], Белл В. (Bell W.) та співавтори [54], Віг Б. (Vig B.) та співавтори [276 - 279]. Всі ці автори проводили дослідження як червоного кісткового мозку, так і клітин периферійної крові хворих на гострий мієлобластний лейкоз (ГМЛ). Рівні ПРЦ при ГМЛ, виявлені цими авторами, співставимі з рівнями ПРЦ при ГМЛ і рівнями ПРЦ при ГЛЛ виявлені нами. Так Галло Дж. наводить рівень ПРЦ 32 % в культурі клітин червоного кісткового мозку несинхронізованої культури клітин хворого на ГМЛ. У наших дослідженнях значення ПРЦ у несинхронізованих культурах КМ хворих на ГМЛ становило в середньому $28,27 \pm 3,84$; а в хворих на ГЛЛ - в середньому $31,70 \pm 3,59$; що близьке до значень, отриманих Галло Дж.

Очевидно, що ПРЦ як новий діагностичний маркер не є вузькоспецифічним ні для ГЛЛ, ні для ГМЛ, ні для гострих лейкозів загалом – високі рівні ПРЦ виявлені при різних патологіях (як онкологічних, так і не онкологічних), що в тому числі представлено і нашими дослідженнями. Чисельні дослідження, в тому числі і наші дослідження, наведені вище, наводять на думку, що ПРЦ є однією з характерних властивостей онкотрансформованих клітин (cancer cell) взагалі. Це нашо вхує на думку, що мутації, які викликають онкотрансформацію клітини, впливають і на процес розділення центромер. Це цілком узгоджується з гіпотезами Віга Б. (Vig B.) та Фіцджеральда П. (Fitzgerald P.) про зв'язок феномена ПРЦ з неоплазіями та процесом онкотрансформації клітин.

У наших дослідженнях була виявлена кореляція між рівнем ПРЦ в периферійній крові та червоному кістковому мозку хворих на ГЛЛ, ГМЛ та рівнем злоякісних бластів в периферійній крові цих хворих. Аналогічну закономірність виявили Галло Дж. та співавтори щодо хворих на ГМЛ. Мала вибірка не дозволила зробити Галло Дж. остаточний

висновок, але наші дослідження з достатньо великою вибіркою дозволяють однозначно стверджувати про наявність такої закономірності. Наші дослідження підтверджують припущення про те, що ПРЦ є типовою загальною ознакою онкотрансформованих злоякісних клітин різного типу.

Феномен ПРЦ був описаний в літературі в низці онкологічних захворювань, зокрема, і при гемопроліферативних захворюваннях (гемобластозах різних типів). Так Белл В., Віг Б. виявили цей феномен при хронічному мієлобластному лейкозі (ХМЛ). Літлфілд Л., Речаві Г. кожен окремо описують феномен ПРЦ, досліджуючи гострий мієлобластний лейкоз (ГМЛ). Белл В. та співавтори досліджували червоний кістковий мозок та периферійну кров у хворих з солідними пухлинами та в хворих на ХМЛ з філадельфійською хромосомою. Вони виявили високі рівні ПРЦ у цих пацієнтів разом з високим рівнем хромосомних аберацій: розривів хромосом, фрагментації хромосом, ерозій хромосом, деспіралізацій хромосом. Після початку терапії Белл В. та співавтори відмітили зменшення рівня чи елімінацію цих аномалій, але відмічали ріст рівня цих аномалій після застосування арабінозиду цитозину, що пояснюють нездатністю цієї сполуки інкорпоруватися в ДНК. Автори зазначають, що феномен ПРЦ проявляється на значно більш високому рівні під час застосування арабінозиду цитозину, аніж у випадках фолат-дефіцитної анемії. Очевидно, що з підвищенням рівня ПРЦ пов'язаний саме внутрішньоклітинний дефіцит фолатів. Фолієва кислота, що безперечно є донором метилового радикалу в процесі метилювання ДНК, бере участь у процесі метилювання прицентромерних районів хромосом, що особливо потребують цього процесу, як регіони багаті на цитозин. Внутрішньоклітинний дефіцит фолатів викликає порушення

процесу метилювання ДНК прицентромерних районів, що в свою чергу зменшує стабільність ДНК цих районів хромосом, що і призводить до феномену ПРЦ. Це на сьогодні лишається гіпотезою, але все більше досліджень свідчать на її користь. Так, Джі В. (Ji W.) та співавтори вважають, що аномалії в прицентромерних районах хромосом обумовлені порушенням метилювання ДНК. Автори показали, що гіпометилізація прицентромерних районів хромосом призводить до нестабільності гетерохроматину, що в свою чергу призводить до збільшення прицентромерних хромосомних аномалій. Під час таких досліджень автори використовували такі інгібітори метилювання, як 5-азадеоксицитидин та 5-азацитидин. Після застосування цих інгібіторів було відмічено збільшення числа прицентромерних аномалій в 1-й хромосомі. Дані, отримані по ходу цих досліджень, підтверджують висновки вищезгаданих авторів – імовірно, механізм виникнення ПРЦ при ГЛЛ та при ГМЛ у дітей теж пов'язаний з внутрішньоклітинним дефіцитом фолатів.

Щодо прогностичного значення С-анафази, в літературі немає даних про рівень С-анафази як прогностичного критерію при ГЛЛ. Нами вперше було виявлено, що високі рівні С-анафази є позитивним прогностичним критерієм перебігу ГЛЛ при стандартній хіміотерапії. Нами вперше було встановлено, що високі рівні С-анафази в першій гострій період свідчать про високу імовірність входження в тривалу ремісію після стандартного протоколу лікування. Наші дослідження вперше дозволяють прогнозувати тривалість ремісії та рецидиви захворювання відповідно до рівня С-анафази в першій гострій період. Прогностичне значення С-анафази та ПРЦ досі не досліджувалось, в літературі немає даних (крім наших досліджень) щодо негативного чи

позитивного прогнозу щодо рівнів ПРЦ та С-анафази в перший гострий період.

Хоча, по даними літератури можна зробити висновок, що С-анафаза властива в більшій мірі старіючим та відмираючим клітинам. Це продемонстрували Мурхед П. (Moorhead P.) та співавтори, Чамла І. (Chamla Y.) та співавтори, Алесандро Е. (Alesandro E.) та співавтори, Корман-Боротто М. (Korman-Borotto M.) та співавтори, Бактон К. (Buckton K.) та співавтори. Очевидно, що відсутність чи низькі рівні С-анафази свідчать про більш високий рівень проліферації і про більш високу життєздатність онкотрансформованих клітин у конкретного індивіда, і навпаки.

Нами розроблено новий критерій ремісії – чисто цитогенетичний. Ми пропонуємо новим критерієм ремісії при ГЛЛ низькі рівні ПРЦ. Нами було виявлено, що під час рецидиву захворювання при ГЛЛ має місце зростання рівня ПРЦ. До аналогічного висновку, тільки на іншому матеріалі – під час дослідження хворих на ГМЛ приходять Літлфілд Л. та співавтори – вони виявили, що при ГМЛ під час ремісії рівні ПРЦ знижуються.

Результати досліджень – як наших, так і різних дослідників свідчать про те, що ПРЦ та С-анафаза виконують принципово різну біологічну роль в процесі онкогенезу: ПРЦ є свідченням (а можливо і причиною) нестабільності геному, є однією з причин утворення анеуплоїдних клонів при різних онкологічних захворюваннях, в першу чергу при гострих лейкозах. Анеуплоїдні клони часто є більш агресивними і більш злоякісними, аніж вихідні мутантні диплоїдні клони. С-анафаза певним чином пов'язана з явищем апоптозу – наразі не зовсім ясно яким, не виключено, що С-анафаза є одним із способів елімінації мутантних клонів або цитологічним проявом цього процесу. Отримані нами

результати свідчать про те, що С-анафаза і процес прогресуючої втрати клітиною ДНК пов'язані або між собою, або з якимось третім явищем. Не виключено, що ми тут маємо справу зовсім з іншою формою апоптозу чи навіть з іншою формою загибелі клітин – клітина гине не за рахунок апоптозу, а внаслідок неможливості завершити мітоз. Зв'язок між рівнем С-анафази та рівнем апоптозу досі окремо не досліджувався – на сьогодні виявлено (в тому числі нами) лише паралельну індукцію апоптозу і цитогенетичних варіантів клітинної конституції.

Висновки Мурхеда П. (Moorhead P.) та співавторів, Чамла Й. (Chamla Y.) та співавторів, Алесандро Е. (Alessandro E.) та співавторів, Бактона К. (Bucton K.) та співавторів, Корман-Боротто М. (Korman-Borotto M.) та співавторів про те, що С-анафаза характерна для старіючих клітин співставима і цікаво доповнює наші дані про те, що С-анафаза і апоптоз можуть бути певним чином пов'язані.

Але не можна виключати версію, що С-анафаза є індикатором якраз не апоптичних, а активно проліферуючих клітин. Можливо, ми маємо справу не з одним явищем, яке ми називаємо С-анафазою, а кількома явищами, що мають однаковий цитологічний прояв.

У роботах Мурхеда П. (Moorhead P.) та в роботах Бактона К. (Bucton K.) було показано, що феномен С-анафази пов'язаний з хворобою Альцгеймера. Не виключено, що автори, досліджуючи цю патологію та феномен С-анафази, теж зіштовхнулись або з явищем апоптозу, або з явищем загибелі клітин в якійсь формі, відмінній від апоптозу. Адже хвороба Альцгеймера властива саме старіючим організмам – очевидно, що явища ПРЦ та С-анафази супроводжують процес старіння клітин і, можливо, патологічний апоптоз. Дані наших досліджень про те, що явище С-анафази пов'язане з явищем апоптозу чи є однією з форм загибелі клітин, цілком вписуються в

цю теорію і підтверджують дані, отримані вищеназваними авторами.

Незалежно від них Чамла Й. та Корман-Боротто М. зіштовхнулись з явищами ПРЦ та С-анафази при цій же патології – при хворобі Альцгеймера. Ці дослідники висунули гіпотезу, що пошкодження хромосом як процес може бути залучене в патогенез хвороби Альцгеймера. Дані про те, що патогенез цієї хвороби пов'язаний з явищем апоптозу, дозволяє з іншої точки зору розглянути результати цих досліджень. Досліджувались цитогенетичні параметри хворих на цю хворобу, в здорових людей похилого віку, в контрольній групі – здорових молодих людей. Була продемонстрована чітка відмінність у цих досліджених групах щодо феноменів ПРЦ, С-анафази та інших хромосомних аномалій (зокрема, рівні поліплоїдії, анеуплоїдії, хромосомних аберацій) та відмінності щодо рівнів апоптозу. Але досі лишається недослідженим зв'язок апоптозу чи загибелі клітин іншого типу з поведінкою центромер. Корман-Боротто М. прийшов до висновку, що різні хромосомні аномалії (включаючи ПРЦ, С-анафазу, поліплоїдію, анеуплоїдію та ін.) пов'язані саме з процесом старіння, а не специфічно з патогенезом хвороби Альцгеймера. Ця думка якраз перегукується з нашою гіпотезою про те, що С-анафаза якось пов'язана з процесом апоптозу, чи навіть є однією зі стадій певної форми апоптозу.

Мурхед П. (Moorhead P.), виявивши підвищений рівень клітин з наявністю довгих ацентричних фрагментів у жінок з хворобою Альцгеймера, висунув гіпотезу, що це пов'язано з феноменом ПРЦ. Співставляючи це з нашими даними, можна сказати, що феномен ПРЦ є причиною багатьох хромосомних аномалій в активно проліферуючих злякисних клонах, зокрема і при гострих лейкозах та лімфомах.

Мехес К. (Mehes K.) досліджуючи хворих на анемію Фанконі (патогенез якої пов'язаний з мутаціями генів, що контролюють репарацію ДНК), виявив у цих хворих підвищені рівні ПРЦ та С-анафази. Виявлені автором випадки ПРЦ торкались в першу чергу хромосом 13, 14, 15. Автор припустив, що феномен ПРЦ може бути одним із проявів хромосомної нестабільності, що в свою чергу пов'язано з ризиком потенційної малігнізації. Мехес К. описав випадок прояву явища ПРЦ хромосоми 3 в новонародженій дівчинки з водяною плоду та в її здорового батька, що обидва є носіями збалансованої транслокації $t(3p;19q)$. Це ще раз підтверджує думку, що феномен ПРЦ не є випадковим і пов'язаний з хромосомним мутагенезом.

Мьюрфі С. (Murthy S.) описав випадок високого рівня ПРЦ (що складав в середньому 20,5 %) у жінки зі спонтанними абортами, що мала дитину з синдромом Дауна. Це підтверджує думку Мехеса К. про те, що феномен ПРЦ є причиною виникнення анеуплоїдних клонів. Ці та інші автори наводили дані про те, що феномен ПРЦ типовий для онкотрансформованих клітин, в тому числі при гострих лейкозах. При різних патологіях різними авторами відмічались паралельно високі рівні ПРЦ і одночасно високі рівні анеуплоїдних клонів. Виникнення анеуплоїдних клонів пов'язує з феноменом ПРЦ Шерес Й. (Scheres J.), що дослідив хворого, який успадкував високий рівень ПРЦ від батьків. Паррі Е. (Parry E.) вважає, що феномен ПРЦ безпосередньо пов'язаний з утворенням анеуплоїдних клонів. Смірнов В. Г. вважає, що феномен ПРЦ призводить до підвищення частоти нерозходження хромосом при мітозі та мейозі. Співставляючи результати досліджень вищезгаданих авторів з нашими даними, ми схильні вважати, що феномен ПРЦ та анеуплоїдія тісно пов'язані, при цьому,

очевидно, ПРЦ є причиною або однією з причин анеуплоїдії.

Досліджуючи роль генетичних факторів у патогенезі множинного склерозу, Алесандро Е. (Alesandro E.) виявив у хворих на множинний склероз високі рівні ПРЦ Х-хромосоми у 50 % хворих. Загалом, щодо феномену ПРЦ і патогенезу таких захворювань, як синдром Альцгеймера та розсіяний склероз, існують дві точки зору: феномен ПРЦ безпосередньо пов'язаний з патогенезом цих хвороб і що феномен ПРЦ пов'язаний виключно з процесом старіння клітин.

Чамла Й. (Chamla Y.) проаналізував випадки, коли дослідники стикалися з феноменами ПРЦ та С-анафази і вивів 5 основних різновидностей патологій, для яких типовими є ці феномени:

1. Мутації, що обумовлюють резистентність до колхіцину.
2. Вади конституції хромосом.
3. Похилий вік та старіння клітин.
4. Хвороба Альцгеймера.
5. Синдром Робертса.
6. Запрограмована загибель клітин.

Власне, Чамла Й. і запропонував розрізнити поняття ПРЦ та С-анафаза. Чамла Й. зареєстрував випадок високого рівня С-анафази в родині з хондродистрофією, де одночасно був виявлений високий рівень тетраплоїдії та мітотичної агрегації хромосом. Можливо, автор зіштовхнувся з особливим варіантом загибелі клітин.

Раєвська Г. Б. та співавтори виявили підвищення рівнів феноменів ПРЦ та С-анафази в хворих на алкоголізм та наркоманію. Співставляючи з даними нашої роботи, можемо стверджувати: такі патології як алкоголізм і наркоманія призводять до посилення таких процесів як підвищення нестабільності хромосом, підвищення рівня

загибелі клітин в організмі, в тому числі підвищення рівня апоптозу та інших форм запрограмованої загибелі клітин.

Вустер Г. (Wuster H.) виявив феномен ПРЦ при контрактурі Дююїрена – захворюванні сполучної тканини, що проявляється в проліферації клітин, які продукують колаген долонь і підошв. Крім феномену ПРЦ в аномальних клонах автор виявив у цих патологічних клітинах трисомію 7 та 8 хромосом. Автор вважає, що патогенез цього захворювання пов'язаний з нестабільністю набору цих хромосом, зокрема з нерозходженням хроматид цих хромосом під час мітозу. Співставляючи дані Вустера Г. з нашими даними, можна сказати, що ці дані теж підтверджують теорію про зв'язок феномену ПРЦ з процесами онкогенезу - злякисного чи доброякісного. Наявність феномену ПРЦ в клітинах може мати наслідком виникнення анеуплоїдних клонів з усіма можливими результатами проліферації цих аномальних клітин, якщо, звісно, ці клони не будуть еліміновані.

Не виключено, що однією з функцій С-анафази є вибіркова елімінація мутантних клітин, тобто біологічна роль С-анафази може полягати в підтримці генетичної стабільності клітини і зведення до мінімуму її хромосомних порушень. Очевидно, що цей механізм вмикається, має місце і під час патогенезу гострих лейкозів та лімфом. Організм таким чином робить спробу усунути мутантний злякисний клон. Цілком можливо, що механізм апоптозу в цьому випадку зовсім інакший і пов'язаний з фолієвою кислотою. Не виключено, що в цих та інших випадках феномен С-анафази пов'язаний з внутрішньоклітинним дефіцитом фолатів чи фолієвої кислоти. Злякисні клітини, інтенсивно розмножуючись, швидко використовують фолати, їх внутрішньоклітинний запас не встигає поновлюватись. Внаслідок цього порушується механізм метилування ДНК

прицентромерних районів, оскільки фоліева кислота є донором метильних радикалів. Внаслідок цього прицентромерна і центромерна ДНК не метилується, не розпізнається відповідними білками-регуляторами, реплікується раніше терміну, і центромера розділяється передчасно. Таким чином, порушується процес нормального розділення центромер у всіх хромосомах одночасно. Внаслідок цього мітоз не отримує нормального завершення, і клітина гине. Не виключено, що побічним продуктом цього процесу є поліплоїдні клони, що виявляються в процесі досліджень у деяких хворих на гострі лейкози та лімфоми.

Отримані нами результати наводять на думку, що С-анафаза є додатковим діагностичним маркером лімфом – в першу чергу негоджкінських лімфом. Виявлено, що для негоджкінських лімфом (НГЛ) типові високі рівні С-анафази і низькі рівні ПРЦ. Дуже високі рівні С-анафази відмічені при негоджкінських лімфомах в клітинах периферійної крові та червоного кісткового мозку. У хворих на НГЛ в периферійній крові рівень С-анафази коливався в межах 35 – 65 % клітин, в середньому $51,27 \pm 1,99$ %; а в клітинах червоного кісткового мозку - в межах 51 – 84 %, в середньому $66,47 \pm 2,19$ %. Такі високі рівні С-анафази не траплялися при інших патологіях і співставимі хіба що з рівнями С-анафаз, що була нами відмічена для окремих випадків мієлодиспластичного синдрому (МДС). У 3 досліджених пацієнтів, що страждали на МДС, були відмічені рівні С-анафази, що досягали 50 % клітин. Аналогічні результати були отримані і описані в літературі Беллом В. (Bell W.) та співавторами. Не виключено, що в цих випадках ми маємо справу з високими рівнями апоптозу чи іншої форми загибелі клітин, що зазначається вище. Механізм запрограмованої загибелі клітин, що запускається в цих випадках, може охоплювати не тільки

клони злоякісних клітин, але і нормальні клітини з нормальних не мутантних ліній, як в червоному кістковому мозку, так і в периферійній крові. Але не виключено, що при лімфомах високі рівні С-анафази є свідченням активної проліферації певних клітинних клонів нормальних лімфоцитів або наслідком якогось іншого процесу. Загалом, зв'язок явищ С-анафази і процесами апоптозу чи інших форм запрограмованої загибелі клітин потребує додаткових досліджень і остаточні висновки тут робити рано. Але цілком можливо, що саме С-анафаза протидіє процесам лейкемізації при лімфомах і поширенню злоякісного клону за межі основного вогнища пухлинного процесу – з лімфатичних вузлів в периферійну кров та в червоний кістковий мозок. Отримані дані наводять на думку, що доцільно використовувати дослідження феноменів ПРЦ та С-анафази в медичній практиці. Як бачимо, феномени ПРЦ та С-анафази є додатковими діагностичними критеріями при низці патологій. Щодо діагностичного значення феноменів ПРЦ та С-анафази знаходимо висновки в різних літературних джерелах. Зокрема, Літлфілд Л. пропонує феномен ПРЦ як додатковий діагностичний критерій при ГМЛ. Як бачимо з результатів як наших досліджень, так і чисельних досліджень різних авторів і ПРЦ, і С-анафаза не є вузькоспецифічними діагностичними маркерами – вони є загальними додатковими критеріями для цілої низки різних захворювань, в першу чергу онкологічних. Але в поєднанні з іншими діагностичними критеріями (в першу чергу клінічними), в поєднанні з аналізом загальної клінічної картини, визначення рівнів ПРЦ та С-анафази може допомогти точно поставити діагноз і зробити певний прогноз перебігу захворювання.

Під час досліджень препаратів хромосом культивованих клітин периферійної крові та червоного

кісткового мозку при різних патологіях виявлялись 3 категорії мітозів: типові метафазні пластинки з характерною X-подібною структурою усіх хромосом, ПРЦ-клітини з передчасним розділенням центромер 1, 2, 3, 4-22-ох хромосом каріотипу та С-анафази. Серед них були класичні С-анафази, в яких сестринські хроматиди знаходились на відстані, що переважала товщину однієї хроматиди, але утримувались поруч і мали характерний вигляд (splied chromatids).

Центромери досліджених хромосом не мали ознак пуфінгу (балонізації) центромери, як при синдромі Робертса (RS-ефект). У жодному випадку ми не зустрічали явища «розщеплення центромер» (centromere spreading – CS), що спостерігалось неодноразово у культивованих клітинах червоного кісткового мозку хворих на ГМЛ та солідні пухлини [94, 144]. Фактично, конституція метафазних хромосом клітин крові і червоного кісткового мозку, яка була притаманна для досліджених нами випадків ГЛЛ, ГМЛ, негоджкінських лімфом у дітей (класичні С-анафази та ПРЦ 1-22 хромосом), не була раніше описана в цитогенетичних працях з онкогематології, єдиним винятком можна вважати публікації щодо випадків ХМЛ, в яких відмічено невідповідну прояву явища ПРЦ хромосом групи G. У решті публікацій наголошувалось на вірогідній експресії явища «розщеплення центромери» (CS), яке маніфестується або пуфінгом центромери, подібно до феномену, який має місце при синдромі Робертса, або створює картину зміщення центромери до теломерних ділянок хромосом та ілюзію утворення трирадіальних (квадрирадіальних) фігур [169].

При всіх відмінностях зовнішніх проявів експресії явищ RS (CS), ПРЦ, С-анафази, є підстави припускати, що вони можуть бути різними ланками одного ланцюга

трансформації каріотипу клітин. На це вказують результати цитогенетичного дослідження культури клітин MDA-MB-488 раку молочної залози після її обробки екстрактом green tea GTE-NP91, що містить поліфеноли [299]. При цьому було відмічено поетапність змін у конституції метафазних хромосом від RS (CS)-ефекту до С-анафази. Постає питання: чому на проаналізованих нами препаратах хромосом явище передчасного розділення центромер реєструвалось не в вигляді RS (CS), а у вигляді С-анафази чи ПРЦ-феноменів? По-перше, маніфестація С-анафази та ПРЦ може бути специфічною ознакою перебігу ГЛЛ, оскільки знахідки RS (CS) при гемобластозах стосувались лише ГМЛ, ХМЛ та лімфоми Беркіта. Але нами були зафіксовані феномени ПРЦ та С-анафази з абсолютно тотожними картинами прояву і при ГЛЛ, і при ГМЛ, ХМЛ, негоджкінських лімфом (НГЛ). По-друге, специфіка цитогенетичної маніфестації ПРЦ та С-анафази може бути обумовлена віком: феномен RS (CS) був зареєстрований виключно у випадках лейкемії, лімфом, солідних пухлин у дорослих, тоді як наша робота є одним із перших цитогенетичних досліджень ПРЦ та С-анафази при гострих лейкозах та лімфомах виключно у дітей. Оскільки в досліджених нами випадках ГЛЛ, ГМЛ, НГЛ у дітей, ПРЦ та С-анафаза маніфестувались саме так, як ми спостерігали, ми дотримуємось думки про принципову роль вікових особливостей перебігу бластогенезу в маніфестації специфічної цитогенетичної картини.

Можна було б припустити, що певну роль в експресії С-анафази та ПРЦ у досліджених нами випадках, відіграли особливості культивування клітин крові і червоного кісткового мозку. Відомо, що за умов дефіциту фолатів і тимідину в культуральному середовищі, яке використовується для ідентифікації ламкості Х-хромосоми (FRAXA) при синдромі Мартіна-Бела, помітно зростає

частота метафазних клітин, що маніфестують С-анафазу [106]. Ми заперечуємо можливість культурального походження ПРЦ та С-анафази в наших дослідженнях, оскільки для ведення культур клітин ми використовували стандартні живильні середовища фірми «Sigma» зі збалансованим вмістом солей та мікроелементів (середовища Ігла та RPMI-1640), і загальний склад культурального середовища, концентрація колхіцину, гіпотонічного розчину і фіксуючого розчину та тривалість експозиції були однаковими і в досліді, і в контрольній групі. Якби прояв ПРЦ та С-анафази був культуральним ефектом, він би відзначався на однаковому рівні і в досліді, і в контролі. Фактично нами було встановлено, що ПРЦ метафазних хромосом та С-анафаза є нетиповими цитогенетичними феноменами культивованих клітин крові і червоного кісткового мозку здорових осіб і дуже поширеними феноменами хворих людей на різні патології.

Отже, ми не вважаємо експресію ПРЦ метафазних хромосом культуральним ефектом, а розглядаємо це явище в контексті патогенезу гострих лейкозів та лімфом у дітей. При цьому ми припускаємо важливу роль внутрішньоклітинного дефіциту фолієвої кислоти у генезі феномену С-анафази. По-перше посилена проліферація трансформованих клітин вимагає інтенсивного відтворення ДНК, яка переважно представлена АТ-парами нуклеотидів. Фолієва кислота є єдиним донором вуглецю та водню для формування метильної групи тиміну. Не виключено, що за умов інтенсивного синтезу ДНК, баланс між споживанням і відновленням внутрішньоклітинного запасу фолатів є порушений, що вже припускалось раніше. По-друге, дослідження ПРЦ розпочалось з його опису у випадках мегалобластної анемії, розвиток якої пов'язаний з дефіцитом вітаміну В12 та фолієвої кислоти. Є чисельні роботи, в яких чітко продемонстровано, що

внутрішньоклітинний дефіцит фолатів призводить до загибелі клітин шляхом апоптозу і саме фолатдефіцитний апоптоз еритробластів лежить в основі патогенезу мегалобластної анемії [155].

Оскільки фолієва кислота є донором метилового радикалу, вона задіяна в процесі метилювання ДНК. Встановлено, що гіпометилювання ДНК центромерних і прицентромерних районів хромосом призводить до нестабільності центромерного гетерохроматину і виникнення аномалій хромосом. Класичним прикладом центромерних аномалій, які виникають на основі гіпометилюваного стану ДНК, є цитогенетична картина ІСФ-синдрому, яка проявляється в деконденсації центромерного гетерохроматину і виникнення багатоплечих хромосом 1 та 16 пар. Основним індикатором рівня метилювання геному вважається вміст 5-метилцитозину. У зв'язку з цим є цікавим припущення, що ПРЦ може бути ефектом цитозину арабінозиду, який застосовується під час лікування солідних пухлин та гемобластозів. Літлфілд Л. зі співавторами відмічав, що якби вони не спостерігали пуфінгу центромери на препаратах хромосом до початку лікування лейкемії, то вважали б це явище ефектом цитозинарабінозиду. Оскільки ми проводили цитогенетичні дослідження до початку цитостатичної терапії за протоколом, то виключаємо можливість медикаментозної індукції ПРЦ та С-анафазі в наших дослідженнях.

У роботах, що присвячені аналізу «передчасного розщеплення центромер» (CS-ефекту) в клітинах червоного кісткового мозку хворих на ГМЛ, цитогенетичні дослідження здійснювались до початку лікування, а умови культивування клітин і виготовлення препаратів хромосом були подібні до застосованих у наших дослідженнях. На загал, CS-ефекти були зареєстровані лише в 4 з 40

обстежених хворих на ГМЛ. Припущення щодо асоціації цього явища з бластними клітинами було зроблено на основі його реєстрації в гострій фазі захворювання, наростання зі збільшенням питомого вмісту бластів та регресії на стадії ремісії. За нашими даними, ПРЦ та С-анафаза були типовими феноменами культур червоного кісткового мозку та периферійної крові в гострій фазі ГЛЛ, ГМЛ, НГЛ, ХМЛ, МДС, ІГПА. Вірогідна різниця з контролем мала місце як за частотою реєстрації випадків ПРЦ та С-анафази, так і за їх питомим вмістом серед загальної популяції мітотичних клітин. Особливо показовим і статистично обґрунтованим у цьому плані виявились випадки ГЛЛ у дітей.

Якщо в контролі явище С-анафази не зустрічалось зовсім, а явище ПРЦ мало спорадичний характер і зустрічалось далеко не в усіх пацієнтів, а на стадії тривалої ремісії у хворих на ГЛЛ ці показники були близькі до значень контрольної групи або статистично достовірно не відрізнялися від показників контрольної групи, то в гострій фазі захворювання ці феномени були відмічені практично в усіх пацієнтів (тільки в окремих випадках явище С-анафази не фіксувалось в першому гострому періоді). Загалом, вважається (і це підтверджують і наші дослідження), що С-анафаза в нормі - в контрольних групах трапляється не частіше, ніж 1 випадок на 1000 мітотичних клітин, тоді як при патологіях явище С-анафази може охоплювати більшість клітин, а іноді (в окремих випадках) і до 100 % досліджених клітин.

Суттєві відмінності між дослідом і контролем були виявлені при дослідженнях структури ПРЦ, а саме кількості хромосом, залучених в це явище, та їх належності до певних хромосомних груп. У контролі та на стадії ремісії в ПРЦ залучались 1-2 хромосоми набору, тоді як у гострій фазі перебігу ГЛЛ мала місце вірогідна

експресія ПРЦ 3-22 хромосом набору. Аналогічну картину ми спостерігали при дослідженнях ГМЛ. За даними літератури в досліджених випадках ГМЛ у феномен CS-феномену в середньому залучалось до 14 хромосом набору. Це узгоджується з нашими даними щодо парадоксальної експресії ПРЦ 3-20 хромосом у гострій фазі ГЛЛ та ГМЛ. Найбільш часто і в досліді, і в контролі в ПРЦ залучались хромосоми групи E. Наступне місце займали хромосоми групи C, за ними зі значно нижчою частотою реєструвалось ПРЦ хромосом груп G, F, A, B, D. У гострій фазі перебігу ГЛЛ спостерігалось достовірне зростання питомої ваги ПРЦ хромосом груп C, E, G та експресія ПРЦ хромосомами груп A, B, F, D, серед яких у нормі це явище практично не зустрічається.

Як було виявлено різними дослідниками, існує чітко визначений порядок розділення хромосом каріотипу на стадії анафази. Першими розділяються центромери хромосом 18, 2, 3, 4, 5, 17, X, тоді як акроцентричні хромосоми груп D та G розходяться в останню чергу. Відомо, що порушення нормального порядку розділення 21 та 18 хромосом, яке було зареєстроване в батьків дітей з синдромом Дауна і синдромом Едвардса, може бути причиною виникнення аутосомних трисомій в таких сім'ях. ПРЦ 21 хромосоми, що теж характеризується пізнім розходженням, знайдено на препаратах хромосом жінки, хворої на ХМЛ. Ми зареєстрували ПРЦ хромосом D та G до настання анафази ще на стадії метафази, що вказує на суттєве порушення порядку розділення центромер у культурах червоного кісткового мозку і периферійної крові хворих на ГЛЛ дітей. При цьому наші дані відповідають результатам дослідження хворих з імунодифіцитом та спадковими синдромами хромосомної ламкості (анемія Фанконі та ін.), в яких на препаратах метафазних хромосом було зареєстровано ПРЦ групи D [125, 156].

Відомо, що вищезгадані синдроми асоціюються з високим ризиком онкогенної трансформації.

Провести більш поглиблений аналіз порядку розходження хромосом каріотипу у нас не було можливості, оскільки G-забарвлення хромосом дає можливість диференціювати хромосоми по парах, але виключає можливість об'єктивної реєстрації факту ПРЦ. Рутинний метод та С-метод забарвлення препаратів хромосом, які було використано в наших дослідженнях, визнані найбільш відповідними до реєстрації явищ ПРЦ та С-анафази. Поруч з хворими на ГЛЛ, ГМЛ, ХМЛ явища передчасного розділення центромер та С-анафази були нами досліджені у хворих на негоджкінські лімфоми (НГЛ), ідіопатичну гіпопластичну анемію та мієлодиспластичний синдром. В усіх досліджених випадках гематологічних патологій у першій гострій фазі захворювання спостерігалась виразна експресія феноменів С-анафази та (або) ПРЦ у популяціях мітотичних клітин червоного кісткового мозку та периферійної крові. При НГЛ практично кожна друга мітотична клітина була в стані С-анафази, середня частота С-анафази була парадоксально високою, статистично достовірно відрізнялася від рівнів С-анафази не тільки в контрольній групі, але і в групах хворих на інші гематологічні захворювання (ГЛЛ, ГМЛ та ін.). У той же час експресія НГЛ виявилась недостовірною щодо контрольної групи, тоді як у хворих на гострі лейкози спостерігалась протилежна тенденція: експресія ПРЦ була вірогідною, тоді як експресія С-анафази не очевидною і мала місце не в усіх пацієнтів. Структура ПРЦ при НГЛ відповідала структурам ПРЦ при ГЛЛ та ГМЛ: так само спостерігалось вірогідне зростання частоти клітин з ПРЦ 3-20 хромосом та залучення в ПРЦ хромосом, які в нормі це явище не демонстрували. Отже, при ГМЛ та НГЛ, так само як при

ГЛЛ, спостерігалась вірогідна експресія явищ ПРЦ та С-анафази в гострій фазі захворювання. При цьому вибіркова маніфестація С-анафази або ПРЦ при НГЛ, ГМЛ, ГЛЛ дозволяє припустити певний зв'язок із патогенезом захворювання.

В усіх досліджених випадках, за виключенням НГЛ та ІГПА, маніфестація явищ ПРЦ та С-анафази відбувалась на стадії бластної кризи, що знайшло своє підтвердження під час вимірювання відносного вмісту бластів в периферійній крові. Шіраші Й. та Літтлфілд Л. зі співавторами першими припустили, що такі мітози можуть відповідати бластним клітинам. Ми зробили спробу статистично обґрунтувати це положення на основі отриманих даних:

1. У випадках, коли препарати хромосом були отримані з 24-годинної культури крові без мітогенної стимуляції клітин, усі метафазні пластинки демонстрували явище С-анафази або ПРЦ. Відомо, що диференційовані лімфоцити не вступають у проліферації фітогемаглютиніном, і лише бластні клітини володіють здатністю до автоматичного поділу. Отже, культура клітин, в яку не було внесено ФГА, не могла містити метафазних пластинок диференційованих клітин, а виключно мітози онкотрансформованих клітин. Тотальна експресія ПРЦ, яка була зареєстрована в усіх подібних випадках, свідчила про ПРЦ та С-анафазу як про специфічні ознаки онкотрасформованих клітин.
2. Частота С-анафази та ПРЦ була достовірно вищою в культурі червоного кісткового мозку, аніж у ФГА-стимульованій культурі клітин периферійної крові. Оскільки в гострій фазі ГЛЛ середній рівень бластів у периферійній крові коливався в межах 0-50 %, а їх рівень в червоному кістковому мозку становив 80-100 % клітин, і саме червоний кістковий мозок був основним

або єдиним джерелом їх надходження у кров. Відповідно до цього, цілком природньо було розцінити достовірно більшу експресію ПРЦ та С-анафази в червоному кістковому мозку як явище, притаманне для лейкемічних клітин.

3. Середня частота ПРЦ та С-анафази пропорційно зростала зі збільшенням рівня бластів у периферійній крові та достовірно відрізнялась у випадку ПРЦ-клітин, що вказувало на високу ймовірність їх спільного походження.
4. Після проведення відповідного кореляційного аналізу встановлено лінійну кореляційну залежність між рівнем бластів у периферійній крові і частотою ПРЦ (з високими коефіцієнтами кореляції) як при ГЛЛ так, і при ГМЛ. Одночасно виявлено відсутність залежності між відсотком бластів в периферійній крові і рівнем С-анафази при гострих лейкозах.
5. Виявлено відсутність залежності між ПРЦ та С-анафази, що підтверджує думку про різну природу цих явищ.
6. Виявлено залежність між рівнем ПРЦ та рівнями анеуплоїдних та поліплоїдних клонів в периферійній крові та червоному кістковому мозку при гострих лейкозах, що дозволяє стверджувати, що ПРЦ є однією з причин нестабільності геному.

Отже, отримані результати дозволяють достовірно обґрунтувати положення, що метафазні клітини з ПРЦ декількох хромосом з високою імовірністю походять від бластних клітин і можуть бути індикаторами бластної кризи при гострих лейкозах у дітей.

Припускають, що найбільш ймовірним наслідком ПРЦ є втрата або набуття дочірніми клітинами поодиноких хромосом, як наслідок, утворення анеуплоїдного каріотипу клітин за хромосомами, які передчасно розійшлися. Анеуплоїдний стан каріотипу клітин лейкемічного клону є

типовою ознакою онкотрансформованих клітин при онкологічних захворюваннях, зустрічається у більш ніж у 70 % випадків ГЛЛ у дітей і вважається однією з найбільш поширених аномалій каріотипу при цій патології. Встановлено чітку асоціацію перебігу ГЛЛ з плоідністю клітин лейкомічного клону, а саме, позитивний прогноз, якщо кількість хромосом з більшою ніж 51 хромосома (гіпердиплоїдний набір). Значно менш сприятливий прогноз за умов, коли плоідність каріотипу близька до нормальної (диплоїдний або псевдодиплоїдний набір хромосом) та несприятливий у випадку гіподиплоїдного набору чи навіть гаплоїдного набору хромосом.

У згаданих роботах, присвячених дослідженню ПРЦ у хворих на ГМЛ, саме ПРЦ згадувалось як можливий механізм виникнення гіподиплоїдії лейкомічних клітин, зареєстрованих в досліджених випадках. Отже, за даними літератури і за нашими даними, що це підтверджують, існує висока імовірність того, що ПРЦ поодиноких хромосом може спричиняти виникнення анеуплоїдного каріотипу клітин. Відповідно до цього було здійснено аналіз взаємодії експресії рівня анеуплоїдії та частоти ПРЦ-клітин на препаратах хромосом культур червоного кісткового мозку і периферійної крові в гострій фазі гострих лейкозів у дітей.

У дітей, хворих на гострі лейкози, в першу чергу на ГЛЛ, анеуплоїдний стан каріотипу клітин червоного кісткового мозку і периферійної крові був у переважній більшості наближений до диплоїдного і лише в декількох випадках – гіподиплоїдний. У середньому відсоток анеуплоїдії не перевищував 12 %, часом частота анеуплоїдії при ГЛЛ охоплювала до 69 % мітотичних клітин, а в контролі частота анеуплоїдного каріотипу ніколи не перевищувала 2 % досліджених клітин і переважно не зустрічалась взагалі (0 %). За результатами

лінійно-кореляційного аналізу встановлено позитивну кореляцію між частотами анеуплоїдних клітин та частотою ПРЦ при гострих лейкозах. Поряд з цим зареєстровано пряму залежність між частотою анеуплоїдного каріотипу та частотою ПРЦ 1-єї хромосоми і високовірогідний зв'язок анеуплоїдії з частотою ПРЦ 4-22 хромосом. Як відзначалося вище, ПРЦ 4-22 хромосом не зустрічалося зовсім у здорових осіб (контрольній групі) і є типовою ознакою гострої фази перебігу ГЛЛ та ГМЛ та інших поширених гемобластозів у дітей. Отримані дані вказують на ПРЦ 4-22 хромосом як на ознаку маніфестації хромосомного дисбалансу, що з високою вірогідністю спричинює виникнення анеуплоїдного каріотипу при ГЛЛ у дітей. Отже, явище ПРЦ з високою імовірністю спричинює виникнення анеуплоїдного каріотипу клітин при гострих лейкозах у дітей.

Під час досліджень зв'язку між характером експресії С-анафази та рівнем бластів у периферійній крові було отримано від'ємний результат лінійно-кореляційного аналізу – лінійно-кореляційний характер залежності не підтвердився. Ознаки цієї залежності з'являлися лише за умов, коли рівень бластів у периферійній крові складав 70 – 100 % клітин. Зворотня динаміка рівня С-анафази та ПРЦ-клітин дала підстави для припущення про конкурентну природу змін в їх відносному вмісті за умов високого бластозу. На нашу думку, зворотній характер зв'язку між частотою С-анафази та ПРЦ-клітин вказує на можливість трансформації ПРЦ-клітин у С-анафазу. На відміну від ПРЦ-мітозу, для С-анафази є характерним передчасне розділення центромер усіх або майже всіх хромосом каріотипу. Така клітина має значно менше шансів на продовження існування, бо через нездатність хромосом до нормальної орієнтації навколо мітотичного веретена вона не може своєчасно і повноцінно забезпечити

повноцінний розподіл генетичної інформації між дочірніми клітинами. При синдромі Робертса, коли майже всі клітини охоплені ПРЦ, близько 40 % фібробластів, які досягають стадії метафази, не здатні завершити мітоз протягом 88 годин. Зупинка мітозу підвищує ризик деструкції ДНК внаслідок діє специфічних гідролітичних ензимів [137], а блок метафазно-анафазного переходу протягом 2,5 годин неминухо призводить до загибелі клітин шляхом індукції апоптозу [229]. У контексті вагомій ролі апоптозу в ембріогенезі слід згадати результати цитогенетичних досліджень ембріональних клітин печінки людини, які відіграють вирішальну роль в процесах гемопоезу ембріонів людини. Як було встановлено Созанським О. О. зі співавторами, важливою цитогенетичною рисою популяції клітин печінки ембріона людини є висока частота клітин з передчасним розділенням центромер більшості хромосом каріотипу. Крім того високий рівень експресії С-анафази притаманний для ембріональних фібробластів.

Отже, клітина, яка під час поділу набуває ознак С-анафази, з високою ймовірністю приречена на загибель. З метою перевірки гіпотези про взаємозв'язок явищ ПРЦ, С-анафази з апоптозом у комплексі здійснювались цитогенетичне і цитофлуориметричне дослідження з метою паралельної реєстрації частоти появи апоптичних клітин, ПРЦ-мітозів та С-анафаз у здорових людей та в дітей, хворих на гемобластози.

Проточна цитофлуориметрія визнана одним із найбільш об'єктивних методів визначення апоптозу. Прогресуюче зменшення кількості нативної ДНК в апоптичних клітинах реєструється на цитофлуориметрії у вигляді додаткового пре-G1 піка, що є маркером апоптозу і відсутній у контрольних зразках. Як додатковий маркер апоптозу визначали рівень міжнуклеосомного

розщеплення ДНК, але в жодному з 5 досліджених випадків не виявлено феномену «драбини» ДНК, що відповідає даним літературних джерел про незначну інформативність цього методу при дослідженні клітин крові *in vivo*. Припускають, що апоптоз, індукований за участю головного комплексу гістосумісності I класу (МНС-I), відбувається за відсутності Fas-індукції і притаманного їй міжнуклеосомного розщеплення ДНК з утворенням характерної «драбини» ДНК. Отже, надалі ми обмежились застосуванням цитофлуориметричного методу для ідентифікації випадків апоптозу клітин.

Як виявилось, у контролі апоптичні клітини практично не виявлялись: їх частота не перевищувала 0,3 %. Достовірно вищий показник частоти апоптичних клітин зареєстровано в червоному кістковому мозку і периферійній крові хворих на гемобластози – 2,4 % в середньому. Значення коефіцієнту кореляції між рівнем апоптичних клітин і рівнем С-анафази у хворих на гемобластози були високими, тоді як лінійний характер зв'язку між рівнем апоптичних клітин і ПРЦ не підтвердився. Найбільш вірогідний позитивно-кореляційний зв'язок між частотою апоптичних клітин та рівнем С-анафази було нами встановлено при вибіркового дослідженні гострих лейкозів. Як виявилось, включення до вибірки результатів досліджень хворих на негоджкінську лімфому значно знижував інформативність дослідження стосовно встановлення характеру зв'язку між цими маркерами. Отже, отримані дані щодо вірогідної позитивної кореляції між відсотком С-анафази і вмістом апоптичних клітин вказують на правомірність нашого припущення, що метафазні клітини з С-анафазою з високою імовірністю походять від бластних клітин, які знаходяться на стадії запрограмованої загибелі.

Апоптоз, як форма запрограмованої загибелі клітин, спрямований на фізіологічну підтримку оптимальної кількості клітин в тканинах і спонтанно виникає практично в усіх злоякісних пухлинах, в тому числі і в популяціях лейкемічних клонів при гострих лейкозах. Чутливість до протипухлинних препаратів, які застосовуються при лікуванні гострих лейкозів та лімфом у дітей, визначається в тому числі здатністю цих препаратів індукувати апоптоз в онкотрансформованих клітинах. За даними Шулера Д. (Schuler D.), Зенде Б. (Szende B.) у дітей, хворих на гострі лейкози, явище апоптозу лейкемічних клітин не реєструвалось до призначення лікування і спостерігалось виключно на фоні цитостатичної терапії, тобто, апоптоз лейкемічних клітин мав вторинний характер, індукувався цитостатиками. Практично одночасно з цими повідомленнями в інших дослідженнях було зареєстровано інтенсивність процесів апоптозу до початку лікування ГЛЛ у дітей. При цьому спонтанна редукція кількості клітин лейкемічного клону шляхом апоптозу складала 4 % на добу при 10 – 11 % приросту обсягу онкотрансформованих клітин, а тому середнє збільшення маси лейкемічних клітин становило 7 % на добу при міжособових варіаціях від 1,2 до 27,3 %. У наших дослідженнях високий рівень С-анафази та апоптичних клітин був зареєстрований до початку цитостатичної терапії і, так само, як і в роботах Гірта А. (Hirt A.) та співавторів, спостерігались значні міжособові коливання рівня С-анафази в зразках червоного кісткового мозку та периферійної крові: від 0 до 55 % клітин (при ГЛЛ) (значення коефіцієнту варіації досягали 100 % відмітки) незалежно від вмісту онкотрансформованих клітин. Одночасно були відмічені досить помірні міжособові коливання рівня ПРЦ-клітин (в межах 30 – 50 %).

Отримані нами дані дозволяють припускати, що міжособова мінливість експресії С-анафази може бути патогенетично обумовленим явищем і мати зв'язок з клінічною гетерогенністю перебігу ГЛЛ. Для обговорення цього припущення був проведений аналіз перебігу захворювання на ГЛЛ в залежності від частоти С-анафази серед клітин червоного кісткового мозку у гострій фазі ГЛЛ. Порівняльний аналіз перебігу захворювання проводився в трьох групах хворих в залежності від питомого вмісту С-анафази на препаратах хромосом:

- 0 – 1 % - 14 осіб;
- 2 – 10 % - 30 осіб;
- 11 – 55 % - 13 осіб.

Після розрахунку середньої частоти С-анафази у кожній групі відбулось значне скорочення міжособової мінливості цієї ознаки (30 – 40 %), що утвердило нас на думці про не випадкову гетерогенність експресії С-анафази в хворих на ГЛЛ і необхідність відповідної рандомізації вибірки при вивченні цього явища. Як виявилось, практично всі випадки летального завершення захворювання або швидкого настання рецидиву ГЛЛ зосередились в I групі хворих, де частота С-анафази реєструвались на рівні контрольних показників (0 – 1 % клітин): 11 з 14 осіб. У групі, де питомий вміст С-анафази становив 2 – 10 % мітотичних клітин, лише у 2 з 30 хворих мало несприятливий перебіг ГЛЛ. У всіх випадках, які відзначались парадоксально високим вмістом С-анафази (11 – 55 %) було досягнуто ремісії ГЛЛ. При розрахунку частоти С-анафази в хворих з несприятливим перебігом захворювання і позитивним прогнозом було отримано дані про високовірогідну підвищену експресію С-анафази в хворих, що увійшли в ремісію.

Отже, прояв С-анафази в гострій фазі перебігу ГЛЛ виявився не випадковим явищем, що може мати діагностичне та прогностичне значення. Гетерогенність досліджених випадків за цією ознакою імовірно залежить від генетично обумовленої здатності організму генерувати явище С-анафази в окреслених межах. Оскільки серед осіб контрольної групи це явище не зустрічалось, воно, ймовірно, потребує індукції, і, зокрема, може бути наслідком розгортання лейкемічного процесу. Виходячи з наших даних, хворі, які увійшли до I групи, володіли недостатньою здатністю генерувати С-анафази, а хворі III групи відзначались підвищеною здатністю до експресії С-анафази, коли в гострій фазі перебігу захворювання С-анафаза складала до 55 % метафазних клітин.

Ми припускаємо, що хворі, які увійшли до III групи, мають підвищену генетично обумовлену здатність до індукції С-анафази подібно до відомих знахідок в осіб з репродуктивними втратами в анамнезі. Стабільно підвищена, незалежна від колхіцину експресія С-анафази в культурах лімфоцитів і фібробластів в таких родинах дозволила припустити аутосомно-домінантний тип успадкування цієї ознаки. Отже, С-анафаза - не артефакт, експресія С-анафази при ГЛЛ або іншій гематологічній патології людини з високою імовірністю є патогенетично обумовленим явищем.

Отже, ми вважаємо, що прояв С-анафази є цитогенетичною ланкою програми клітинного суїциду. За нашими даними, ПРЦ метафазних хромосом є високоімовірною ознакою каріотипу бластних клітин, а його диференціація відповідає питомому вмісту бластів, які зберігають здатність до самовідтворення (ПРЦ-клітини) або завершують своє існування (С-анафази).

Неспроможність організму генерувати С-анафазу може свідчити про його нездатність своєчасно блокувати поділ онкотрансформованих клітин і, за нашими даними, асоціюється з поганим прогнозом гемобластозів у дітей. З іншого боку, прояв С-анафазу може розцінюватись як свідчення здатності організму до ефективної елімінації бластних клітин ще до початку цитостатичної терапії і вказувати на позитивний прогноз та ефективність лікування за протоколом. Вірогідна різниця прояву явищ ПРЦ та С-анафазу в нормі та на різних етапах перебігу ГЛЛ і вірогідний зв'язок з індукцією апоптозу чи іншої форми клітинного суїциду вказують на перспективність врахування явищ ПРЦ та С-анафазу з діагностичною і прогностичною метою в клінічній онкогематології.

ВИСНОВКИ

1. Феномен ПРЦ у більшій мірі притаманний злоякісним бластним клітинам, аніж нормальним проліферуючим клітинам чи диференційованим лімфоцитам при гострих лейкозах у дітей.
2. У здорових людей, і зокрема, в здорових дітей в червоному кістковому мозку та в периферійній крові феномен ПРЦ зустрічається рідко, а феномен С-анафазу не зустрічається зовсім.
3. Феномен С-анафазу має прогностичне значення – його високий рівень в першому гострому періоді ГЛЛ до початку лікування є позитивним прогностичним критерієм і свідчить про високу ймовірність входження в тривалу ремісію після лікування хіміотерапією згідно загальноприйнятого протоколу.
4. Низький рівень С-анафазу в першому гострому періоді ГЛЛ до початку лікування є негативним прогностичним

критерієм і свідчить про високу ймовірність рецидиву чи високу ймовірність летальності.

5. Новим критерієм ремісії ГЛЛ є низький рівень ПРЦ.
6. Під час рецидиву має місце зростання рівня ПРЦ.
7. При інших формах лейкозів (зокрема при ГМЛ) має місце аналогічний прояв ПРЦ та С-анафази.
8. ПРЦ та С-анафаза мають принципово різну біологічну роль в процесі онкогенезу: ПРЦ є свідченням нестабільності геному і є імовірною причиною утворення анеуплоїдних клонів і посилення злоякісності та агресивності лейкемічних клонів.
9. ПРЦ є додатковим неспецифічним діагностичним критерієм ГЛЛ та ГМЛ у дітей, в тому числі, критерієм ранньої діагностики ГЛЛ та ГМЛ.
10. Феномени ПРЦ та С-анафази за своєю структурою і залученістю в явище різної кількості хромосом і різних груп хромосом мають різний прояв при різних формах гострих лейкозів і при різних формах ГЛЛ у дітей, що теж може бути додатковим діагностичним і прогностичним критерієм.
11. Феномен С-анафази є додатковим діагностичним критерієм негоджкінських лімфом у дітей.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Рекомендуємо використовувати визначення рівня феноменів ПРЦ та С-анафази в клінічній лабораторній практиці.
2. Рекомендуємо використовувати визначення рівнів феноменів ПРЦ та С-анафази як додаткові діагностичні критерії ГЛЛ, ГМЛ, НГЛ, ППА.
3. Рекомендуємо використовувати визначення рівня С-анафази в першому гострому періоді ГЛЛ до початку лікування як прогностичний критерій перебігу ГЛЛ.
4. Рекомендуємо вважати високі рівні С-анафази в першому гострому періоді позитивним прогностичним критерієм перебігу ГЛЛ.
5. Рекомендуємо вважати низькі рівні С-анафази в першому гострому періоді ГЛЛ негативним прогностичним критерієм перебігу ГЛЛ, що свідчить про високу ймовірність рецидиву.
6. Рекомендуємо використовувати визначення С-анафази як додатковий діагностичний критерій негоджкінських лімфом (НГЛ) у дітей.

ПОДЯКИ

Висловлюю глибоку подяку д. б. н. Акопян Гаяне Рубенівні за ідею досліджень, керівництво моєю науковою роботою на ранніх етапах її виконання, консультації щодо методів та підходів досліджень. Висловлюю глибоку подяку д. б. н. Новаку Василю Леонідовичу за наукові консультації щодо виконання цієї роботи. Висловлюю глибоку подяку колективу Львівської обласної дитячої спеціалізованої лікарні (ЛОДСЛ) за допомогу і сприяння у виконанні цієї роботи. Я глибоко вдячний головному лікарю ЛОДСЛ світлій пам'яті Миндюку Олександровичу Володимировичу, що в 1990 – 2000 роках керував ЛОДСЛ і всебічно сприяв цій науковій роботі. Я глибоко вдячний колективу гематологічного відділення ЛОДСЛ за участь і допомогу у виконанні цієї роботи, в першу чергу, завідувачці гематологічним відділенням Поліщук Романі Степанівні за всебічну допомогу в цих наукових дослідженнях. Висловлюю персональну подяку Петруху Андрію Васильовичу – завідувачу клінічної лабораторії ЛОДСЛ в 1990 – 2000 роках, коли на базі цієї лабораторії виконувався основний об'єм досліджень, за його особисту участь в проведенні досліджень на проточному цитофлуориметрі.

Література

1. Акопян Г. Р., Сиренко А. Г., Гнатейко О. З., Петрух А. В., Стойка Р. С. С-анафаза как цитогенетический маркер апоптоза клеток при остром лимфобластном лейкозе у детей // Экспериментальная онкология. – 1999. – N21(2). – С. 127 - 132.
2. Акопян Г. Р., Гнатейко О. З., Сіренко А. Г., Поліщук Р. С., Логінський В. Є., Новак В. Л. Передчасне розділення центромер метафазних хромосом при гострій лімфобластній лейкемії у дітей // Онкология. – 1999. - N4. – С.283 - 289.
3. Акопян Г. Р., Сиренко А. Г., Гулеюк Н. Л., Дзись Е. И. Явление преждевременного расхождения хроматид во взаимосвязи с процессами дифференциации клетки // Тез. докл. Первый (третий) Российский съезд медицинских генетиков. - М., 1994. - С. 220 - 221.
4. Акопян Г. Р., Сіренко А. Г. та ін. Передчасне розділення центромер метафазних хромосом та баланс гетерохроматину в геномі клітин із різним ступенем дифереціації. Г. Р. Акопян, А. Г.Сіренко, Н. Л. Гулеюк, А. В. Петрух, П. Мале // Тези доп. 2 з'їзду мед. генетиків України. - Львів. - 1995.- С. 6.
5. Акопян Г. Р., Сіренко А. Г., Поліщук Р. С. Прогнозування сімейних випадків лейкемії на основі нових цитогенетичних маркерів онкотрансформації клітин // Матеріали V з'їзду ВУЛТ. Конф."Сучасні пробл. перв. мед-сан. допомоги" (28-29 травня, Київ). Укр. - Мед. Вісті, 1999, т. 3. – с. 45.
6. Албрерс Б., Брей Л., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. Т. 3. – М.: Мир, 1987. – 282 с.
7. Владимирская Е. В., Румянцев А. Г. Особенности патогенеза острых лейкозов у детей // Гематол. трасфуз. – 1991. - № 1. – С. 8.

8. Владимирская Е. Б., Торубарова Н. А. Острые лейкозы и гоноплазии кровотожения у детей. – М.: Медицина, 1994. – 207 с.
9. Воронцов И. М., Алексеев Н. А. Лейкозы у детей. – М.: Медицина, 1998. – 247 с.
10. Гематология детского возраста / Под ред. Н. А. Алексеева. - СПб.: Гиппократ, 1998. - С. 221-236.
11. Гематологические болезни у детей / Под ред. М. П. Павловой. - Минск: Вышэйшая школа, 1996. - С. 47 - 62.
12. Давиденкова Е. Ф., Шерман С. И., Колосова Н. Н. Клиника и генетика лейкозов. – Ленинград: Медицина, 1973. – 174 с.
13. Захаров А. Ф., Бенюш В. А. Хромосомы человека. – М.: Медицина, 1982. – 253 с.
14. Ковалева Л. Г. Острые лейкозы. – М.: Медицина, 1990. – 271 с.
15. Кіцера Н. І., Козій Р. С., Полішук Р. С., Сіренко А. Г. Цитогенетичний та клініко-генеалогічний аналіз хронічної мієло-моноцитарної лейкемії у дитини // Лікарська справа. – 1999. – № 1 (1043). – С.129 - 131.
16. Козинец В. И., Макарова В. А. Исследование системы крови в клинической практике. – М.: Триада-Х, 1998. – 480 с.
17. Лозинська Р. М. Особливості каріотипу соматичних клітин у ранньому онтогенезі і при вагітності у людини. – Автореф. ... дис. канд. біол. наук. – К., 1992. – 20 с.
18. Лванга С. К. (ред.) Обучение медицинской статистике. Двадцать конспектов лекций и семинаров. – Женева: ВОЗ, 1989. – 216 с.
19. Майданников В. П. Педиатрия. – Харьков: Фолио, 2002. - С. 775 - 782.

20. Раевская Г. Б., Минков Е. Г., Цветкова Т. Г. Преждевременное рахождение центромер метафазных хромосом у больной наркоманией и алкоголизмом // Бюлетень експериментальної біології і медицини. – 1997. - № 124 (9). – С. 6.
21. Руководство по гематологии / Под ред. А. И. Воробьева. В 2 т. - М.: Медицина, 1985. - Т. 2. - С. 135 - 146.
22. Сіренко А. Г. Центромера і рак. – К.: Українська видавнича спілка, 2001. – 150 с.
23. Сіренко А. Г. Феномен передчасного розходження центромер і гострі лейкози. - К.: Українська видавнича спілка, 1999. – 92 с.
24. Сіренко А. Г. Феномен передчасного розділення центромер хромосом при гострому лімфобластному лейкозі // Бюлетень Всеукраїнського Наукового та Професійного Товариства ім. Миколи Міхновського: Медицина. Медична генетика. Екологія людини. – 1998. - №7. - С. 4 - 11.
25. Сіренко А. Г. Передчасна анафаза як новий цитогенетичний маркер неходжкінської лімфоми // Бюлетень Всеукраїнського Наукового та Професійного Товариства ім. Миколи Міхновського: Медицина. Медична генетика. Екологія людини. - 1998. – N 7. - С. 11 - 15.
26. Сіренко А. Г., Акоюн Г. Р. Передчасне розділення центромер як цитогенетичний маркер гострої лейкемії у дітей // Збірник наукових праць “Проблеми екології та медичної генетики і клінічної імунології». - Вип. 4 (24). – К. - Луганськ. – 1999. – С. 122 - 133.
27. Смирнов В. Г. Цитогенетика. – М.: Высшая школа, 1991. – 247 с.
28. Созанский О. А., Яворская О. М., Савранский Э. Ф. Изучение хромосом кроветворных клеток эмбриона

- человека // Тезисы докладов V съезда ВОГИС им. Вавилова. – М., 1987. – С. 110.
29. Фильченков А. А., Стойка Р. С. Апоптоз (Физиологическая гибель клетки). – К.: Осень, 1995. – 24 с.
 30. Фильченков А. А., Стойка Р. С. Апоптоз и рак. – К.: Морион, 1999. – 184 с.
 31. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека. Т. 2 – М.: Мир, 1990. – 320 с.
 32. Шабалов Н. П. Детские болезни. - СПб.: Питер, 1999. - С. 736 - 746.
 33. Шлома Д. В., Созанський О. О., Гулеюк Н. Л. Особливості хромосомного апарату та функціонального стану щитовидної залози при аменореях у жінок // Цитол. генет. – 1993. – Т. 27, № 4. – С. 55 – 61.
 34. Acton A. Aplastic anemia. – Scholarly Editions, 2013. - 36 p.
 35. Akao Y., Seto M., Yamamoto K. The RCK gene associated with t(11;14) translocation is distinct from the AML/ALL-1 gene with t(4;11) and t(11;19) translocations // Cancer research. – 1992. – N 52(21). – P. 6083 – 6087.
 36. Akopian H. R., Sirenko A. G., Sednieva I. A., Nevzgodina N. M. Chromosomal evaluation of apoptosis in embryonic tissues and placenta // Inf. Conf. "Placentogenic monitoring and ecotoxicologic aspects genetic disease." Krakow.Poland. - 2000. - P. 8.
 37. Akopian G. R., Sirenko A. G. et al. Cytogenetic study of peripheral blood lymphocytes and bone marrow cells in acute infant lymphoblastic leukaemia. G.R.Akopian, A.G.Sirenko, N.L. Guleyuk, E.I. Dzis, Y.J. Havryluk, O.Z. Hnateiko // Abstr. World Congress "Child Health-2000", Vancouver, May, 28-June, 1, 1995. - P. 169.

38. Akopian G. R., Sirenko A. G. et all. Premature anaphases possibly relates to apoptosis / G. R. Akopian, A. G. Sirenko, O. Z. Hnateiko, R. S. Stojka // Abstr.2-nd European Cytogenet.Conference July 3-6, 1999, Vienna, Austria. – Cytogenetic & Cell Genetic. – 1999. - V.85, N 1 - 2. - P. 34.
39. Akopian G. R., Sirenko A. G., Hnateiko O., Hulejuk N., Malet P. Premature anaphases as a possible cytogenetic indicator of apoptosis // Cytogenetic & Cell Genetic. - 1997. - V. 77. – N 1-2. – P. 93.
40. Alessandro E., Di Cola M., Vaccarella C. Nonrandom chromosome changes in multiple sclerosis // American Journal Medical Genetic. – 1990. – V. 37, N 3. – P. 406 – 411.
41. Anderson J. R., Vose J. M., Bierman P. J. At all. Clinical features and prognosis of follicular large-cell lymphoma: a report from the Nebraska // Lymphoma Study Group Journal Clinical Oncology. – 1993. - N 11. – P. 218 – 224.
42. Angell R., Ledger W., Yong E. Cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes // Human Reproduction. – 1991. – N 6(4). – P. 568 – 573.
43. Angioni A., Ghione F., Miano C. Unusual t(3;12) (q28;q13) in childhood acute lymphoblastic leukemia // Cancer Genetic & Cytogenetics. – 1991. – N 55(2). – P. 261 – 263.
44. Aplan P. D., Lombardi D. P., Reaman G. H., Sather H. N., Hammond G. D., Kirsch I. R. Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia // Blood. - 1992. - N79 (5). – P. 1327 – 33.
45. Arieta M. I., Martinez B., Nunez M. Premature centromere division: a cytogenetic study // Cytologia (Tokyo). – 1995. – V. 60, N 2. – P. 159 – 165.

46. Aron E. Alfred Velpeau (1795 - 1867) Une carrière exceptionnelle // Histoire des Sciences Médicales. – 1994. - V. XXVIII. – P. 101 - 107.
47. Aurer L., Sparkes R., Schiller G. Ph-chromosome positive acute lymphoblastic leukemia is t(9;22) the initial abnormality? // American Journal of Hematology. – 1993. – N 43(1). – P. 61 – 62.
48. Auxenfants E., Morel P., Lai J. Secondary acute lymphoblastic leukemia with t(4;11): report on two cases and review of the literature // Annals of Hematology. – 1992. – N 65(3). – P. 143 – 146.
49. Bajalica S., Sorensen A., Pedersen T. et al. Chromosome painting as a supplement to cytogenetic banding analysis in non-Hodgkin's lymphoma // Genes Chromosomes & Cancer. - 1993. - N 7. – P. 231 - 239.
50. Bajnoczky K., Cardo S. “Premature anaphase” in a couple with recurrent miscarriage // Human genetic. – 1993. – V. 92, N 4. – P. 388 – 390.
51. Bajnoczky K., Mehes K. Parental centromere separation sequence and aneuploidy in the offspring // Human Genetic. – 1988. – V. 78, N 3. – P. 286 – 288.
52. Bakhoun S. F., Silkworth W. T., Nardi I. K., Nicholson J. M., Compton D. A., Cimini D. The mitotic origin of chromosomal instability // Current Biology. – 2014. – V. 24. – P. 148 – 149.
53. Bhatia K., Huppi K., McKeithan T., Siwarski D., Mushinski J. F., Magrath I. Mouse bcl-3: cDNA structure, mapping and stage-dependent expression in B lymphocytes // Oncogene. - 1991. - N6 (9), - P. 1569 – 73.
54. Bell W., Whang J., Carbone P. Cytogenetic and morphologic abnormalities in human bone marrow cells during cytosine arabinoside therapy // Blood. – 1966. – V. 27, N 6. – P. 771 – 781.

55. Bentz M., Cabot B., Moos M. Detection of chimeric BCR-ALB genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia // *Blood*. – 1994. – N 83(7). – P. 1922 – 1928.
56. Berger R. Cytogenetics of acute leukemia // *Leukemia*. – 1992. – N 6(2). – P. 7 – 11.
57. Berger R. Molecular cytogenetic of acute lymphoblastic leukemia // *Nouvelle revue française d'hématologie*. – 1991. – N 33(2). – P. 86 – 91.
58. Berger R. Translocation t(8;21) (q22;q22): cytogenetic and molecular biology // *Nouvelle revue française d'hématologie*. – 1994. – N 36(1). – P. 967 – 969.
59. Berger R., Coniat M., Derre J. et al. 5q-anomaly in acute lymphoblastic leukemia // *Cancer genetic & Cytogenetics*. – 1992. – N 61(2). – P. 201 – 203.
60. Bernat R., Delanoy M., Rothfield N. et al. Disruption of centromere assembly during interphase inhibits kinetochore morphogenesis and function in mitosis // *Cell*. – 1991. – N 66. – P. 1229 – 1338.
61. Bickel S., Wymar D., Orr-Weaver T. et al. Mutation analysis of the *Drosophila* sister-chromatid cohesion protein ORD and its role in the maintenance of centromeric cohesion // *Genetics*. – 1997. – N 146(4). – P. 1319 – 1331.
62. Biondi A., Rambaldi A., Rossi V. et al. Detection of ALL-1/AF4 fusion transcript by reverse transcription-PCR for diagnosis and monitoring of acute leukemia with the t(1;4) translocation // *Blood*. – 1993. – N 82(10). – P. 2943 – 2947.
63. Bloom K., Constanzo V. Centromere structure and function // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* – 2017. – V. 56. – P. 515 – 539.
64. Borrero S., Antinolo G., Parody R. et al. Translocation (14;18) in a patient with common acute lymphoblastic leukemia (FAB L2) // *Cancer Genetics & Cytogenetics*. – 1993. – N 65(2). – P. 177 – 178.

65. Brinkley B., Zinkovski R., Mollon W. et al. Movement and segregation of kinetochores experimentally detached from mammalian chromosomes // *Nature*. – 1993. – N 336. – P. 251 – 254.
66. Buckton K. E., Whalley L. J., Christin J. I. et al. Chromosome changes in Alzheimer's Precemial Dementia // *Journal Medical Genetic*. – 1983. – V. 20, N1. – P. 45 – 51.
67. Buecher E. M., Fessler R., Beutler C. et al. Incidental findings of double minutes (DM), single minutes (SM), homogenously staining regions (HRS), premature chromosome condensation (PCC) and premature chromosome division (PCD)? // *Annals Genetic*. – 1987. – V 30, N 2. – P. 75 – 79.
68. Burger H., Nooter K., Zaman G. et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in acute and chronic leukemia // *Leukemia*. – 1994. – N 8(6). – P. 990 – 997.
69. Burkin D., Jones C., Burkin H. et al. Sheep CENPB and CENPC genes show a high level of sequence similarity and conserved synteny with their human homologs // *Cytogenetics & Cell Genetics*. – 1996. – N 74 (1-2). – P. 86 – 89.
70. Bunn F. H., Aster J. C. Chapter 21: Acute Leukemia // *Pathophysiology of Blood Disorders*. — The McGraw-Hill Companies, Inc., 2011. — C. 244 — 259.
71. Cabanillas F., Pathak S., Trujillo J. Frequent nonrandom chromosome abnormalities in 27 patients with untreated large cell lymphoma and immunoblastic lymphoma // *Cancer Research*. – 1988. - N 48. – P. 5557 – 5564.
72. Cage W. The case of the late professor Hughes Bennett // *British Medical Journal*. – 1875. – V. 2 (771). – P. 453 – 454.

73. Calafell J., Badenas J., Egozcue J. et al. Premature chromosome condensation as sign of oocyte immaturity // *Human Reproduction*. – 1991. – N 6(7). – P. 1017 – 1021.
74. Chamla Y. C-anaphases in lymphocyte cultures versus premature centromere division syndromes // *Human Genetic*. – 1988. – V. 78, N 2. – P. 111 – 114.
75. Chan R., Hardy W., Laing M., Muller W. The Catalytic Activity of the ErbB-2 Receptor Tyrosine Kinase Is Essential for Embryonic Development // *Molecular Cell Biology*. - 2017. – N 22. – P. 1073 – 1078.
76. Chauffaille M., Coutinho V., Kerbauy J. et al. Simplified method for the analysis of cellular karyotype and phenotype in leukemias // *Revista Paulista de Medicina*. – 1992. – N 110 (3). – P. 97 – 101.
77. Chenevix-Trench G., Brown J. A., Tyler G. B. Chromosome analysis of 30 cases of non-Hodgkin's lymphoma // *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy*. – 1988. - V. 5, N1. – P. 17 – 32.
78. Chin Y., Bosco J., Koh C. et al. Breakpoint cluster region (BCR) gene rearrangement studies in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia // *Medical Journal of Malaysia*. – 1992. – N 47(2). – P. 110 – 113.
79. Cho S. Y., Kim S. Y., Jeon Y. L. A novel three-way ph variant t(8;9;22) in adult acute lymphoblastic leukemia // *Annals of Clinical and Laboratory Science*. - 2011. – vol. 41. – P. 71 – 78.
80. Clark M., Kumar P. (eds.) *Aplastic anemia: new insights for the Healthcare Professional*. Scholarly Editions. - Kumar & Clark's clinical medicine (7th ed.). Edinburgh: Saunders Elsevier, 2011. – 210 p.
81. Clarkson B. Consistent genetic abnormalities in human cancer as targets for selective therapies // *Mount Sinai Journal of Medicine*. – 1992. – N 59(5). – P. 400 – 404.

82. Cleary M. L., Smith S. D., Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation // *Cell*. - 1986. - N 47 (1). - P. 19 - 28.
83. Colsolini R., Pui C. H., Behm F. G. et al. In vitro cytotoxicity of docetaxel in childhood acute leukemias // *Journal Clinical Oncology*. - 1998. - V. 16, N 3. - P. 907 - 913.
84. Corona-Rivera A., Salamanca-Gomez F., Lucina Bobadilla-Morales L. et al. Cell cycle and centromere FISH studies in premature centromere division // *Medical Genetics*. - 2005. - N 6. - P. 33 - 43.
85. Croce C. M. Molecular biology of lymphomas // *Seminars in Oncology*. - 1993. - N 20. - P. 31 - 46.
86. Darwiche N., Freeman I. Characterization of components of the putative mammalian sisters chromatid cohesion complex // *Gene*. - 1999. - V. 233, N 1-2. - P. 39 - 47.
87. Dave B. J., Hess M. M., Pickering D. L. Rearrangements of chromosome band 1p36 in non-Hodgkin's lymphoma // *Clinical Cancer Research*. - 1999. - N 5. - P. 1401 - 1402.
88. Davey F., Lawrence D., McCallum J. et al. Morphologic characteristics of acute lymphoblastic leukemia (ALL) with abnormalities of chromosome 8, band q24 // *American Journal of Hematology*. - 1992. - N 40(3). - P. 183 - 191.
89. Devaraj P., Foroni L., Sekhar M. et al. E2/HLF fusion cDNA and the use of RT-PCR for the detection of residual disease in t(17;19) (q22;q13) acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. - 1994. - N 8(7). - P. 1131 - 1138.
90. De Zern A. E., Brodsky R. A. Clinical management of aplastic anemia // *Expert Review of Hematology*. - 2014. - V. 4 (2). - P. 221 - 230.

91. Dietich C. U., Krone W., Hochsattel R. et al. Cytogenetic studies in tuberous sclerosis // *Cancer Genetic & Cytogenetic*. – 1990. – V. 45, N 2. – P. 161 – 178.
92. Dominigues A., Ramon-Morales F., Romero F. et al. Hpttg, a human homologue of rat pttg, is over expressed in hematopoietic neoplasm. Evidence for a transcriptional activation function of hpttg // *Oncogene*. – 1998. – V. 17, N 17. – P. 2187 – 2193.
93. Dowing J., Head D., Raimondi S. et al. The der(11)-encoded MLL/AF-4 fusion transcript is consistently detected in t(4;11) (q21;23)-containing acute lymphoblastic leukemia // *Blood*. – 1994. – N 83(2). – P. 330 – 335.
94. Eisenberg L. Rudolf Virchow: the physician as politician // *Medicine and War*. – 1986. – V. 2 (4). – P. 243 – 250.
95. Erikson J., Ar-Rushidi A. Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene locus in undifferentiated B-cell lymphomas // *Science*. – 1993. – N 219. – P. 963 – 967.
96. Fenaux P., Lai J. L., Miaux O. et al. Burkitt cell acute leukaemia (L3 ALL) in adults: a report of 18 cases // *Br. J. Haematol*. – 2004. - N 71 (3). – P. 371 - 376.
97. Fernandes R., Cotter T. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death // *Biochemical Pharmacology*. – 1994. – N 48(4). – P. 675 – 681.
98. Finver S. N., Nishikura K., Finger L. R., Haluska F. G., Finan J., Nowell P. C., Croce C. M. Sequence analysis of the Myc oncogene involved in the t(8;14)(q24;q11) chromosome translocation in a human leukemia T-cell line indicates that putative regulatory regions are not altered // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 1988. – N 85 (9). – P. 3052 – 3056.

99. Fitzgerald P. Premature centromere division // Human genetic. – 1992. – N 90 (1-2). – P. 190 – 191.
100. Fletcher J., Tu N. Tantravahi R. et al. Extermely poor prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia with translocation (9;22): updated experience // Leukemia & Lymphoma. – 1992. – N 81(1-2). – P. 75 – 79.
101. Fogu G., Gabbas A., Angius A. et al. Tranlocazione compresa (5;15;17) in caso di leukemia acuta promielocitica // Haematologia. – 1991. – N 72(2). – P. 209.
102. Fujimoto N., Marujama S., Ito A. et al. Establishment of an estrogen responsive rat pituitary cell sub-line MtT/E-2 // Endocrinology Journal. – 1999. – V 46, N 3. – P. 389 – 396.
103. Fujiwara M., Soga N., Kurokawa I. et al. De novo Ph-negative acute T-lymphoblastic leukemia with BCR gene rearrangement // Leukemia. – 1994. – N 8(3). – P. 510 – 512.
104. Fukagawa T., Brown W. Efficient conditional mutation of the vertebrate CENP-C gene // Human Molecular Genetics. – 1997. – N 6(13). – P. 2301 – 2308.
105. Forsburg S. L. The CINs of the centromere // Biochemical Society Trans. – 2013. – V. 41. – P. 1706 – 1711.
106. Fuster C., Miro R., Barrios L. et al. Introduction of premature centromere division affecting all chromosomes under culture conditions of fragile site expressions // Cancer Genetics & Cytogenetics. – 1992. – N 58(2). – P. 153 – 154.
107. Gabarron J., Jimenez A., Glover G. et al. Premature centromere division dominantly inherited in subfertile family // Cytogenetic & Cell Genetic. – 1986. – V. 43, N 1-2. – P. 69 – 71.

108. Gallo J., Misava S., Testa J. et al. Centromere spreading in acute nonlymphoblastic leukemia // *Cancer Genetic & Cytogenetic.* – 1984. – V 12, N 2. – P. 105 – 109.
109. Gansler T. Application of DNA cytometry in pediatric pathology // *Perspective Pediatric Pathology.* – 1992. – N 15. – P. 83 – 105.
110. Garg A., Aggarwal B. B. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development // *Leukemia.* - 2002. - N16 (6). – P. 1053 – 68.
111. Gibbons B., Czepulkowski B. Cytogenetic in acute lymphoblastic leukemia // *Human Cytogenetic.* – 1992. – N 1. – P. 67 – 95.
112. Gibbons B., McCallum P., Watts E. et al. Near haploid acute lymphoblastic leukemia: seven new cases and review of the literature // *Leukemia.* – 1991. – N 5(9). – P. 738 – 743.
113. Goasguen J., Dossot J., Farbel O. et al. Expression of multidrug resistance-associated P-glycoprotein (P-170) in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications // *Blood.* – 1993. – N 82 (11 - 12). - P. 3505 – 3507.
114. Godey C., Gonzales-Garcia J., Estaban M. et al. Kinetochores and chromatin diminution in early embryos of *Parascaris univalent* // *The Journal of Cell Biology.* – 1992. – V. 118, N 1. – P. 23 – 32.
115. Golub T., Berker G., Bohlander S., et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML 1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* – 1995. – N 92 (11). – P. 4917 – 4921.
116. Gorman A., Samali A., McGowan A. et al. Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells // *Cytometry.* – 1997. – N 29(2). – P. 97 – 105.

117. Greaves M. Stem cell origins of leukemia and curability // *British Journal of Cancer*. – 1993. N 67(3). – P. 413 – 423.
118. Gruber A., Vitols S., Norgen S. et al. Quantitative determination of *mdr 1* gene expression in leukemia cells from patient with acute leukemia // *British Journal of Cancer*. – 1992. – N 66(2). – P. 266 – 272.
119. Hammond D. W., Goepel J. R., Aitken M. Cytogenetic analysis of a United Kingdom series of non-Hodgkin's lymphomas // *Cancer Genetics and Cytogenetics*. – 1992. – N 61. – P. 31 - 38.
120. Hara J., Kawa-Ha K. T-cell receptor alpha and delta gene assembly in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. – 1992. – N 7(5-6). – P. 363 – 370.
121. Hardingham J., Peters G., Debrovich A. et al. A rare translocation (4;11) (q21; p14-15) in an acute lymphoblastic leukemia expressing T-cell and myeloid markers // *Cancer Genetics & Cytogenetics*. – 1991. – N 56(2). – P. 255 – 262.
122. Heaney A., Horwitz G., Wang Z. et al. Early involvement of estrogen-induced tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis // *Natural Medicine*. – 1999. – V. 5, N 11. – P. 1317 – 1321.
123. Heerema N., Palmer C., Weitman R. et al. Cytogenetic analysis in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. – 1992. – N 6(3). P. 185 – 192.
124. Heikinheimo O., Lanzendorf S. E., Baka S. G., Gibbons W. E. Cell cycle genes *c-mos* and *cyclin-B1* are expressed in a specific pattern in human oocytes and preimplantation embryos // *Human Reproduction*. – 1995. – N 10 (3). – P. 699 – 707.
125. Heim S., Mitelman F. *Cancer Cytogenetics. Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of*

- Tumor Cells. - New York: Alan R. Liss, 1995. – P. 266 - 309.
126. Higa T., Okabe M., Kunieda Y. Establishment and characterization of a new Ph-positive ALL cell line (ALL/MIK) presenting bcr gene rearrangement on bcr-2 and ALL-type bcr/alb transcript: suggestion of in vitro differentiation to monocytoid lineage // *Leukemia & Lymphoma*. – 1994. – N 12(3-4). – P. 287 – 296.
 127. Hirt A., Leibundgurt K., Lethy A. et al. Cell birth and death in childhood acute lymphoblastic leukemia: how fast does the neoplastic cell clone expand // *British Journal Hematology*. – 1997. – V. 98, N 4. – P. 999 – 1001.
 128. Hjalt T. A. H., Murray J. C. Genomic structure of the human retinoic acid receptor-alpha1 gene // *Mammalian Genome*. - 1999. - N 10. – P. 528 – 529.
 129. Hoelzer D., Ludwig W. D., Thiel E. et al. Improved outcome in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia // *Blood*. – 1996. – N 87 (2). – P. 495 - 508.
 130. Hofmann W. K., Komor M., Wassmann B. et al. Presence of the BCR-ABL mutation Glu255Lys prior to STI571 (imatinib) treatment in patients with Ph+ acute lymphoblastic leukemia // *Blood*. – 2003. – N 102. – P. 659 - 661.
 131. Hogge D. Cytogenetic and oncogenes in leukemia // *Current Opinion in Oncology*. – 1994. – N 6(1). – P. 3 – 13.
 132. Hunger S., Brown R., Cleary M. et al. DNA-binding and transcriptional regulatory properties of hepatic leukemia factor (HLF) and the t(17;19) acute lymphoblastic leukemia chimera E2A-HLF // *Molecular & Cellular Biology*. – 1994. – N 14(9). – P. 5986 – 5996.
 133. Hungerford D. Leucocytes culture from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosome by treatment with hypotonic KCl // *Stain Technology*. – 1965. – N 40. – P. 333 – 338.

134. Ito C., Reibeiro R. C., Behm F. G. et al. Cyclosporine A induces apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia cells // *Blood*. – V. 91, N 3. – P. 1001 – 1007.
135. Izraeli S., Janssen J., Haas O. et al. Detection and clinical relevance of genetic abnormalities in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a comparison between cytogenetic and PCR analyses // *Leukemia*. – 1993. – N 7(5). – P. 671 – 678.
136. Izraeli S., Lion T. Multiprimer-PCR for screening of genetic abnormalities in acute lymphoblastic leukemia // *British Journal of Hematology*. – 1991. – N 79(4). – P. 645 – 647.
137. Jabs E., Tuck-Muller C. M., Cusano R. et al. Studies of mitotic and centromeric abnormalities in Roberts syndrome: implication for a defect in the mitotic mechanism // *Chromosoma*. – 1991. – V. 100, N 4. – P. 251 – 261.
138. Jani-Sait S., Raimondi S., Look A. et al. A t(11;12) 11q23 leukemic breakpoint that disrupts the MLL gene // *Genes, Chromosomes & Cancer*. – 1993. – N 7(1). – P. 28 – 31.
139. Jenkins E., Sanz M., Ray J. et al. Distribution of diploidy, polyploidy and endoreduplication in fra(X) positive and negative lymphocytes, amniocytes and chorionic villi // *American Journal Medical Genetic*. – 1991. – N 38 (2 -3). – P. 434 – 436.
140. Ji W., Hernandez R., Zhang X. et al. DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1 // *Mutation Research*. – 1997. – N 379(1). – P. 33 – 41.
141. Johansson B., Mertens F., Mitelman F. et al. Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemia // *Leukemia*. – 1994. – N 8(6). – P. 953 – 962.

142. Jones N., Shannon P., Cutz E. et al. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection // *American Journal of Pathology*. – 1997. – N 151(6). – P. 1695 – 1703.
143. Juneja S., Lukeis R., Tan L., Cooper I. et al. Cytogenetic analysis of 147 cases of non-Hodgkin's lymphoma: nonrandom chromosomal abnormalities and histological correlations // *The British Journal of Haematology*. – 1990. - N 76. – P. 231 - 237.
144. Kamio T., Ito E., Ohara A. et al. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group // *Hematologica*. - 2011. – № 96 (6). – P. 814 – 819.
145. Kajtar P., Mehes K. Bilateral Coats retinopathy associated with aplastic anemia and mild dyskeratotic sings // *American Journal Medical Genetic*. – 1994. – V. 49, N 2. – P. 374 - 377.
146. Kallio M., Lahdetie J. Famentation of centromeric DNA and prevention of homologous chromosome separation in male mouse meiosis in vivo by the topoisomerase II inhibitor etoposide // *Mutagenesis*. – 1996. – N 11(5). – P. 435 – 443.
147. Kasper D. L., Braunwald E., Fauci A. et al. *Harrison's principles of internal medicine*. 16th ed. - New York: McGraw-Hill, 2005. – 506 p.
148. Kehrer H., Krone W., Shindler D. et al. Cytogenetic studies of scin fibroblast cultures from a karyotypically normal female with diskeratosis congenita // *Clinical Genetic*. – 1992. – V. 41, N 3. – P. 129 – 134.
149. Kende G., Toren A., Mandel M. et al. Familial leukemia: description of two kindred and a review of the genetic aspects of the disease // *Acta Hematologica*. – 1994. – N 92(4). – P. 208 – 211.

150. Kenderian S. S., Al-Kali A., Gangat N. et al. Monosomal karyotype in Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia // *Blood Cancer Journal*. – 2013. - N 3. – P. 122 - 130.
151. Keser I., Gunduz G. Premature centromere division in three unrelated families // *Annales de Genetique*. – 1996. – N 39(2). – P. 87 – 90.
152. Kerrebrock A., Moore D., Wu J. et al. Mei-S332 a drosophila protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions // *Cell*. – 1995. – N 83. – P. 247 – 256.
153. Kita K., Nishii K., Ohishi K. et al. Frequent gene expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor in CD7⁺ acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. – 1993. – N 7(8). – P. 1184 – 1190.
154. Korman-Bortolotto M., de Arruda Cardoso S. Alzheimer's disease and ageing: a chromosomal approach // *Gerontology*. – 1993. – N 39(1). – P. 1 – 6.
155. Koury M., Horne D., Brown Z. et al. Apoptosis of late-stage erythroblasts in megaloblastic anemia: association with DNA damage and macrocyte production // *Blood*. – 1997. – N 89. – P. 4617 – 4623.
156. Kowalczyk J., Chobotow M., Sladowska G. et al. Translocation (Y;2) in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Cancer Genetic & Cytogenetics*. – 1991. – N 56(1). – P. 7 – 10.
157. Krance R., Raimondi S., Dubovy R. et al. T(12;17) (p13; q21) in early pre-B acute lymphoid leukemia // *Leukemia*. – 1992. – V 6(4). – P. 251 – 255.
158. Kunieda Y., Okabe M., Kurosava M. et al. Chronic myeloid leukemia presenting ALL-type BCR/ALB transcript // *Annals of Hematology*. – 1994. – N 69(4). – P. 189 – 193.

159. Kurup S., Abramsson A., Li J. P., Lindahl U., Kjellen L., Betsholtz C., Gerhardt H., Spillmann D. Heparan sulphate requirement in platelet-derived growth factor B-mediated pericyte recruitment // *Biochemical Society Transactions*. - 2006. - N 34 (3). - P. 454 – 5.
160. Lampert F., Harbott J., Ritterbach J. et al. Cytogenetic findings in acute leukemia in infants // *British Journal of Cancer*. - 1992. - N 18. - P. 20 – 22.
161. Landis S. H., Murray T., Bolden S. *Cancer Statistics // CA: a cancer journal for clinicians*. - 1998. - N 48. - P. 6 - 29.
162. LeBeau M. M. Chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphomas // *Seminars in Oncology*. - 1990. - N 17. - P. 20 – 29.
163. LeBrun D. P. E2A basic helix-loop-helix transcription factors in human leukemia // *Frontiers in Bioscience*. - 2003. - N 8 (1–3). - P. 206 – 222.
164. Le Deley M. C., Reiter A., Williams D. et al. European Intergroup for Childhood Non-Hodgkin Lymphoma: Prognostic factors in childhood anaplastic large cell lymphoma: results of a large European intergroup study // *Blood*. - 2008. - V. 111. - P. 1560.
165. Lee E. J., Petroni G. R., Schiffer C. A. et al. Brief-duration high-intensity chemotherapy for patients with small noncleaved-cell lymphoma or FAB L3 acute lymphocytic leukemia: results of cancer and leukemia group B study 9251 // *Journal Clinical Oncology* - 2001. - N 19 (20). - P. 4014 - 4022.
166. Lee I., Seong C. Cloning and expression of human cDNA encoding human homologue of pituitary tumor transforming gene // *Biochemistry and molecular biology international*. - 1999. - V. 47, N 5. - P. 891 – 897.
167. Lessard N., Fenneteau O., Sainty D. et al. Translocation t(1;19) in acute lymphoblastic leukemia patients with

- cytological presentation simulating L3-ALL (burkitt-like) // *Leukemia & Lymphoma*. – 1993. – N 11 (1 – 2). – P. 149 – 152.
168. Levine E. G., Bloomfield C. D. Cytogenetics of non-Hodgkin's lymphoma // *The Journal of the National Cancer Institute Monographs*. – 1990. – N 10. – P. 7 – 12.
169. Littlefield L., Joiner E., Sayer A. et al. Premature separation of centromeres in marrow chromosomes from an untreated patients with acute myelogenous leukemia // *Cancer Genetic and Cytogenetic*. – 1985. – V. 16, N 2. – P. 109 – 116.
170. Litz C., McClure J., Coad J. Methylation status of the major breakpoint cluster region in Philadelphia chromosome negative leukemia // *Leukemia*. – 1992. – N 6(1). – P. 35 – 41.
171. Loeber G., Kittler L., Beensen V. et al. Differential effects of treatment with UV-light 365 nanometres and 8-methoxypsoralen on chromosomes of healthy persons and psoriatic patients // *Biomedica biochimica acta*. – 1986. – V. 45, N 3. – P. 343 – 352.
172. Locasciulli A., Oneto R., Bacigalupo A. et al. Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) // *Haematologica*. – 2007. – V. 92 (1). – P. 11–8.
173. Lorenzen J., Thiele J., Fisher R. et al. The mummified Hodgkin cell: cell death in Hodgkin's disease // *Journal of Pathology*. – 1997. – N 182(3). – P. 288 – 298.
174. Lowe L., Heerema N., Cheerva A. et al. A new nonrandom chromosomal abnormality, t(2;16) (p11.2; p11.2), possibly associated with poor outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Cancer Genetics & Cytogenetics*. – 1992. – N 64(1). – P. 60 – 64.

175. Madan K., Lindhout D., Palan A. et al. Premature centromere division (PCD): a dominantly inherited cytogenetic anomaly // *Human Genetic.* – 1987. – V. 77, N 2. – P. 193 – 196.
176. Marschalek R., Nilson I., Löchner K., Greim R., Siegler G., Greil J., Beck J. D., Fey G. H. The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene // *Leukemia & Lymphoma.* - 1997. - N27 (5–6). – P. 417 – 428.
177. Mathew P., Sanger W. G., Weisenburger D. D. 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. - N 89. – P. 1678 – 1685.
178. Matsubara K., Kubota M., Adachi S. et al. Induction of apoptosis in childhood acute leukemia by chemotherapeutic agents: failure to detect evidence of apoptosis in vivo // *European Journal of Hematology.* – 1994. – N 52(1). – P. 47 – 52.
179. Maung Z., McLean F., Reid M. et al. The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukemia // *British Journal of Hematology.* – 1994. – N 88(1). – P. 105 – 109.
180. McCabe C. J., Gittoes N. PTTG – a new pituitary tumor transforming gene // *Journal Endocrinology.* – 1999. – V. 162, N 2. – P. 163 – 166.
181. Mehes K., Bajnonoczky K. Unusually early dividing chromosomes 13 – 15 in child with retinoblastoma and 13q deletion // *Human Genetic.* – 1982. – V. 61, N 25(4). – P. 78.
182. Mehes K., Buhler E. Premature centromere division: a possible manifestation of chromosome instability // *American Journal of Medical Genetic.* – 1995. – N 56(1). – P. 76 – 79.

183. Mehes K., Kosztolanyi G. Premature centromere division of a translocation-carrier autosome // *Human Genetic.* – 1990. – V. 85, N 3. – P. 379 – 380.
184. Mehes K., Kosztolanyi G. A possible mosaic form of delayed centromere separation and aneuploidy // *Human Genetic.* – 1992. – V. 88, N 4. – P. 477 – 478.
185. Mehes G., Tarnok A., Mehes K. Objective analysis of centromere separation // *Human Genetics.* – 1996. – N 97(3). – P. 365 – 366.
186. Mellentin J. D., Smith S. D., Cleary M. L. *lyl-1*, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif // *Cell.* - 1989. – N 58, - P. 77 – 83.
187. Melo J., Gordon D., Tuszynsky A. et al. Expression of the ABL-BCR fusion gene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* – 1993. – N 81(10). – P. 2488 – 2491.
188. Merck M. Professional Edition, Aplastic anemia (Hypoplastic anemia). – London, 2007. – P. 120 – 145.
189. Michiell M., Giacca M., Fanin R. et al. MDR-1 gene amplification in acute lymphoblastic leukemia prior to antileukemic treatment // *British Journal of Hematology.* – 1991. – N 78(2). – P. 288 – 289.
190. Miller K., Mueller W., Winkler L. et al. Mitotic disturbance associated with mosaic aneuploidies // *Human Genetics.* – 1990. – V. 84, N 4. – P. 361 – 364.
191. Miniou P., Jeanpierre M., Bouchis D. et al. Alpha-satellite DNA methylation in normal individuals and in ICF patients: heterogeneous methylation in normal individuals and in ICF patients: heterogeneous methylation of constitutive heterochromatin in adult and fetal tissues // *Human Genetics.* – 1997. – V. 99, N 6. – P. 738 – 745.
192. Mitchell A., Jeppesen P., Nicol L. et al. Epigenetic control of mammalian centromere protein binding: does

- DNA methylation have a role? // *Journal of Cell Science*. – 1996. – N 109(9). – P. 2199 – 2206.
193. Mitchelmore C. E., Troelsen J. T., Sjoestroem H., Noren O. The HOXC11 homeodomain protein interacts with the lactase-phlorizin hydrolase promoter and stimulates HNF1alpha-dependent transcription // *Journal of Biological Chemistry*. - 1998. – N 273. – P. 13297 — 13306.
194. Mitelman F. *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer*. Ed. 5. - New York: Wiley-Liss, 1994. – 50 p.
195. Mitelman F., Heim S. Quantitative acute leukemia cytogenetics // *Genes, Chromosomes & Cancer*. – 1992. – N 5(1). – P. 57 – 67.
196. Mitelman F., Mertens F., Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia // *Nature Genetics*. – 1997. – N 15. – P. 417 – 474.
197. Moorhead P. S., Heyman A. Chromosome studies of patients with Alzheimer disease // *American Journal Medical Genetic*. – 1993. – V. 14, N 3. – P. 545 – 556.
198. Moorman A. V. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial // *The Lancet Oncology*. – 2010. – Vol. 11, Issue 5. – P. 429 – 438.
199. Morgan G., Cotter F., Katz F. et al. Breakpoints at 11q23 in infant leukemia with the t(11;19) (q23; p13) are clustered // *Blood*. – 1992. – N 80(9). – P. 2172 – 2175.
200. Mrozek K., Bloomfield C. D. Cytogenetics of non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease // *Neoplastic Diseases of Blood*. – New York: Churchill Livingstone, 1996. – P. 835 - 862.
201. Murphy S. B. Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkins-lymphomas:

- dissimilarities from lymphomas in adults // *Seminar Oncology*. - 1980. - V. 7. - P. 332.
202. Murrey A. A snip separates sisters // *Nature*. - 1999. - V. 400. - P. 19 - 20.
203. Murthy S., Prabhara K. Mitotic disturbances associated with inversion 9qh. A case report // *Annals of Genetic*. - 1990. - V. 33, N 3. - P. 169 - 172.
204. Nazareth L., Thompson E. Leukemic cell apoptosis caused by constitutively active mutant glucocorticoid receptor fragments // *Recent Progress in Hormone Research*. - 1995. - V. 50. - P. 417 - 421.
205. Nowell P. C., Croce C. M. Chromosome translocations and oncogenes in human lymphoid tumors // *The American Journal of Clinical Pathology*. - 1990. - N 94. - P. 229 - 237.
206. Numata S., Kato K., Horibe K. et al. New E2A/PBX1 fusion transcript in a patient with t(1;19) (q23;p13) acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. - 1994. - N 8(4). - P. 587 - 594.
207. Nylund S., Ruutu T., Saarinen U. et al. Detection of minimal residual disease using fluorescence DNA in situ hybridization: a follow-up study in leukemia and lymphoma patients // *Leukemia*. - 1994. - N 8(4). - P. 587 - 594.
208. Offit K., Chaganti R. S. K. Chromosomal aberrations in non-Hodgkin's lymphoma // *Biologic and clinical correlations. Hematology / Oncology Clinics of North America*. - 1991. - N 5. - P. 853 - 869.
209. Orr-Weaver T. L. The difficulty in separating sisters // *Science*. - 1999. - V. 285. - P. 344 - 345.
210. Paietta E., Gucalp R., Wiernik P. et al. Monosomy 7 in multilineage and acute lymphoblastic leukemia // *British Journal of Hematology*. - 1991. - N 79(2). - P. 152 - 155.

211. Palau F., Prieto F., Badia L. et al. Chromosome 5 abnormalities in acute lymphoblastic leukemia // *Cancer Genetic & Cytogenetics*. – 1991. – N 52(2). – P. 173 – 179.
212. Parry E. Chromosome segregation and aneuploidy // *Mutagenesis*. – 1995. – N 10(6). – P. 561 – 563.
213. Pathak S. Centromere or telomere: who is boss? // *Anticancer research*. – 1995. – P. 173 – 179.
214. Pei L. Genomic organization and identification of an enhancer element containing binding sites for multiple proteins in rat pituitary tumor-transforming gene // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V. 273, N 9. – P. 5219 – 5225.
215. Pei L. Pituitary tumor-transforming gene protein S10 and a novel human homologue of DNA in testicular cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274, N 5. – P. 3151 – 3158.
216. Peinemann F., Bartel C., Grouven U. First-line allogeneic hematopoietic stem cell transplantation of HLA-matched sibling donors compared with first-line ciclosporin and/or antithymocyte or antilymphocyte globulin for acquired severe aplastic anemia // *The Cochrane database of systematic reviews*. - 2013. – Vol. 7. – P. 32 – 56.
217. Pennisi E. Cell division gatekeepers identified // *Science*. – 1998. – V. 279. – P. 477 – 478.
218. Perry C., Eldor A., Soreq H. Runx1/AML1 in leukemia: disrupted association with diverse protein partners // *Leukemia Research*. - 2002. - N26 (3). - P. 221 – 228.
219. Petrucci M., De Felice L., Riccardi M. et al. Stem cell factor and PIXY-321 in acute lymphoblastic leukemia: in vitro study on proliferative effects and apoptosis // *Cytokines & Molecular Therapy*. – 1996. – N 2(4). – P. 225 – 230.
220. Pluta A. F., McKay A. M., Ainsztein A. M., Goldberg I. G., Earnshaw W. C. The Centromere: Hub of

- Chromosomal Activities // Science. - 1995. - V. 270 (5242). - P. 1591 - 1594.
221. Preudhorne C., Dervite I., Wattei E. et al. Clinical significance of p53 mutation in newly diagnosed Burkitt's lymphoma and acute lymphoblastic leukemia: a report of 48 cases // Journal of Clinical Oncology. - 1995. - N 13(4). - P. 812 - 820.
222. Priest J., Blakston R., Pearse L. et al. Molecular evidence for true isochromosome 21q // Human Genetic. - 1988. - V. 81, N 1. - P. 1 - 3.
223. Pui C., Crist W. Cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia correlates with clinical feature and treatment outcome // Leukemia & Lymphoma. - 1992. - N 7(4). - P. 259 - 274.
224. Pui C. H., Jeha S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia // Nature Reviews Drug Discovery. - 2007. - vol. 6 (2). - P. 149 - 165.
225. Rabbitts T. H. Chromosomal translocations in human cancer // Nature. - 1994. - N 372. - P. 143 - 149.
226. Raimondi S., Robertson P., Pui C. et al. Hyperdiploid (47 - 50) acute lymphoblastic leukemia in children // Blood. - 1992. - N 79(12). - P. 3245 - 3252.
227. Rao N., Joshi N., Shinde S. et al. Premature separation of centromere and aneuploidy: an indicator of high risk in unaffected individuals from familial breast cancer families? // European Journal of Cancer Prevention. - 1996. - N 5(5). - P. 343 - 350.
228. Rasool O., Heyman M., Brandter L. et al. P15ink4B and p16ink4 gene inactivation in acute lymphoblastic leukemia // Blood. - 1995. - N 85(12). - P. 3431 - 3436.
229. Rattner J., Hendzel M., Furbee C. et al. Topoisomerase II α is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for

- proper centromere and kinetochore structure // *Journal of Cell Biology*. – 1996. – N 134(5). – P. 1097 – 1107.
230. Ravandi F., Kebriaei P. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia // *Hematology & Oncology Clinics of North America*. – 2014. - Volume 23, Issue 5. – P. 1116 – 1126.
231. Reardon D., Hanson C., Roth M. et al. Lineage switch in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia // *Cancer*. – 1994. – N 73(5). – P. 1526 – 1532.
232. Rechavi G., Bercowicz M., Rosner E. et al. Chromosomal aberrations suggestive of mutagen related leukemia after 21-years of “therapeutic” random exposure // *Cancer Genetic & Cytogenetics*. – 1990. – V. 48, N 1. – P. 125 – 130.
233. Reiter A., Schrappe M., Ludwig W. D. et al. Favorable outcome of B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood: a report of three consecutive studies of the BFM group // *Blood*. – 1992. - N 80 (10). – P. 2471 - 2478.
234. Rey S., Ponnathur V., Huang Y. et al. 1- β -D-arabinofuranosylcytosine-, mitoxantrone- and paclitaxel-induced apoptosis in HL-60 cells: improved method for detection of internucleosomal DNA fragmentation // *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*. – 1994. – N 34(5). – P. 365 – 371.
235. Rezk S. A., Zhao X., Weiss L. M. et al. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoid proliferations, a 2018 update // *Human Pathology*. - 2018. – V. 79. – P. 18 – 41.
236. Rivera H., Dominigues M. C-anaphase versus premature centromere division // *Human Genetic*. – 1992. – N 90(1-2). – P. 187 – 188.
237. Romana S., Mauchauffe M., Le Coniat M. The t(12; 21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion // *Blood*. – 1995. – N 85(12). – P. 3662 – 3670.

238. Rovira C., Edstrom J. Centromeric polymerase III transcription units in *Chironomus pallidivittatus* // *Nucleic Acids Research*. – 1996. – N 24(9). – P. 1662 – 1668.
239. Rowley J. D. Chromosome studies in the non-Hodgkin's lymphomas: the role of the 14;18 translocation // *American Society of Clinical Oncology*. – 1988. - V. 6, N 5. – P. 919 – 925.
240. Rudd N. L., Teshima I. E., Martin R. H. et al. A dominantly inherited cytogenetic anomaly: a possible cell division mutant // *Human Genetic*. – 1983. – V. 65, N 5. – P. 117 – 121.
241. Russo C., Carroll A., Kohler S. et al. Philadelphia chromosome and monosomy 7 in childhood acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group study // *Blood*. – 1991. – N 77(5). – P. 1050 – 1056.
242. Saes C., Japon M., Rumos F. et al. Hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasia // *Oncogene*. – 1999. – V. 18, N 39. – P. 5473 – 5476.
243. Sandberg A. Chromosome abnormalities in human leukemia // *Mutation research & fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*. – 1991. – N 247(2). – P. 231 – 240.
244. Sanger W. G., Armitage J. O., Bridge J. A. et al. Initial and subsequent cytogenetic studies in malignant lymphoma // *Cancer*. – 1987. - N 60. – P. 3014 – 3019.
245. Sanyal M., Tung J. W., Karsunky H., Zeng H., Selleri L., Weissman I. L., Herzenberg L. A., Cleary M. L. B-cell development fails in the absence of the Pbx1 proto-oncogene // *Blood*. – 2007. - N 109 (10). – P. 4191 – 9.
246. Scappaticca S., Cerimele D., Tondi M. et al. Chromosome abnormalities in tuberous sclerosis // *Human Genetic*. – 1998. – V. 79, N 2. – P. 151 – 156.

247. Scheinberg P., Young N. S. How I treat acquired aplastic anemia // *Blood*. - 2012. V. 120 (6). – P. 1185 – 96.
248. Schiffer D., Cavalla P., Chio A. et al. Tumor cell proliferation and apoptosis in medulloblastoma // *Acta Neuropathologia*. – 1999. – N 87(4). – P. 362 – 370.
249. Schoch C., Rieder H., Freud M. et al. Twenty-three cases of acute lymphoblastic leukemia with translocation t(4;11) (q21; q23): the implication of additional chromosomal aberrations // *Annals of Hematology*. – 1995. – N 76(7). – P. 167 – 169.
250. Schuler D., Szende B. Apoptosis and acute lymphoblastic leukemia in children // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1997. – N 824. – P. 28 – 37.
251. Schwab M., Cristian P., Amler L. C. Genomic instability in 1p and human malignancies // *Genes, Chromosomes and Cancer*. – 1996. - N 16. – P. 211 - 229.
252. Secker-Walker L. M., Cooke H. M., Browett P. J. et al. Variable Philadelphia breakpoints and potential lineage restriction of bcr rearrangement in acute lymphoblastic leukemia // *Blood*. – 1988. - N 72 (2). – P. 784 - 791.
253. Shah N. P., Witte O. N., Denny C. T. Characterization of the BCR promoter in Philadelphia chromosome-positive and -negative cell lines // *Molecular and Cellular Biology*. - 1991. – N 11. – P. 1854 - 1860.
254. Shiah S., Chuan S., Chau Y. et al. Activation of c-jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis through an oxidation dependent pathway // *Cancer Research*. – 1999. – N 59(2). – P. 391 – 398.
255. Shiraishi Y., Taguchi H., Niiya K. Diagnostic and prognostic significance of chromosome abnormalities in marrow and mitogen response of lymphocytes of acute nonlymphoblastic leukemia // *Cancer Genetic & Cytogenetics*. – 1982. – V. 5, N 1. – P. 1 – 24.

256. Shtil A., Mandlekar S., Yu R. Differential regulation of mitogen-active protein kinases by microtubulin-binding agents in human breast cancer cells // *Oncogene*. – 1999. – N 18(2). – P. 377 – 384.
257. Sirenko A., Akopian G. Premature centromere division of the chromosomes at the different stages of acute lymphoblastic leukemia in infants // *Pediatric research*. - 1997. - 41(5). - P. 774.
258. Sirenko A.G., Acopian G.R., Petrukh A.V. Premature centromere division of metaphase chromosome and blood cell differentiation // *Cytometry*. - 1996. - N8. - P.99.
259. Sirenko A. G., Akopian G.R. PCD-phenomenon and blood cell differentiation // *Abstr. XII meeting of the International society of haematology (European and African Division. Istanbul, Turkiye, sept. 3-8 1995. - Istanbul, 1995. - P.29.*
260. Sithanandam G., Kolch W., Duh F. M., Rapp U. R. Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies // *Oncogene*. - 1990. - N 5 (12). – P. 1775 – 80.
261. Skarin A. T., Dorfman D. M. Non-Hodgkin's lymphomas. Current classification and management // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. - N 47. – P. 351 - 372.
262. Sladka M., Otova B. Chromosome 11 participation in acute lymphoblastic leukemia in Sprague-Dawley rats // *Folia Biologica*. – 1994. – N 40(4). – P. 173 – 183.
263. Smithgall T. E., Rogers J. A., Peters K.L., Li J., Briggs S. D., Lionberger J. M., Cheng H., Shibata A., Scholtz B., Schreiner S., Dunham N. The c-Fes family of protein-tyrosine kinases // *Critical Reviews in Oncogenesis*. - 1998. - N9 (1). – P. 43 – 62.
264. Sotomatsu M., Hayashi Y., Kawamura M. et al. Establishment of new human pre-B acute lymphoblastic leukemia cell line (KMO-90) with t(1;19) carrying p53

- gene alterations // *Leukemia*. – 1993. – N 7(10). – P. 1615 – 1620.
265. Spina D., Leoncini L., Megha T. et al. Growth patterns of diffuse non-Hodgkin's lymphomas estimated from mitotic and apoptotic indices // *International Journal of Cancer*. – 1997. – N 73(2). – P. 178 – 183.
266. Stok W., Thirman M., Dodge R. et al. Detection of MLL gene rearrangement in adult acute lymphoblastic leukemia. A Cancer and leukemia Group B study // *Leukemia*. – 1994. – N 8(11). – P. 1918 – 1922.
267. Stone J., Sandberg A. Sex chromosome aneuploidy and aging // *Mutation Research*. – 1995. – N 338 (1 – 6). – P. 107 – 113.
268. Stursberg S., Riwar B. Cloning and characterization of mammalian SMC1 and SMC3 genes and proteins, componentus of the DNA recombination complex RC-1 // *Gene*. – 1999. – V. 228, N 1 – 2. – P. 1 – 12.
269. Taub J., Ravindranath Y., Mohamed A. et al. Acute lymphoblastic leukemia in 46,XX/47,XXY mosaic male: clonal origin of leukemia in the XY-bearing stem-cell line // *American Journal of Diseases of Children*. – 1993. – N 147(11). – P. 1254 – 1255.
270. Theodossiou C., Scalise A., Troy K. et al. Del (5q) in acute lymphoblastic leukemia with biphenotypic and early progenitor phenotype // *Cancer Genetics & Cytogenetics*. – 1992. – N 63(2). – P. 89 – 94.
271. Thirman M., Gill H., Burnett R. et al. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloblastic leukemia with t(11q23) chromosomal translocations // *New England Journal of Medicine*. – 1993. N 329(13). – P. 909 – 914.
272. Tisdale J. F., Maciejewski J. P., Nunez O. et al. Late complications following treatment for severe aplastic anemia (SAA) with high-dose cyclophosphamide (Cy):

- follow-up of a randomized trial // *Blood*. - 2002. - V. 100 (13). - P. 4668 - 4670.
273. Uhlmann F., Lottspeich F. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesion submit *Sccl* // *Nature*. - 1999. - V. 400. - P. 37 - 42.
274. Urashima M., Iori H., Fujisava K. Establishment and characteristics of a T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line JK-T1 with a chromosomal translocation between 8q24 and 14q13 // *Cancer Genetics & Cytogenetics*. - 1992. - N 64(1). - P. 86 - 90.
275. Vann Etten R. The molecular pathogenesis of the Philadelphia-positive leukemia: implications for diagnosis and therapy // *Cancer Treatment & Research*. - 1993. - V. 64. - P. 295 - 325.
276. Vig B. Sequence of centromere separation: occurrence, possible, significance and control // *Cancer Genetic & Cytogenetics*. - 1983. - N 8. P. 249 - 274.
277. Vig. B. Out-of-phase separation of a G-group chromosome in a woman with chronic myelogenous leukemia // *Cancer Genetic & Cytogenetics*. - 1984. - V. 12, N 2. - P. 167 - 169.
278. Vig B. The centromere: kinetochore complex // *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*. - 1995. - N 26(1). - P. 68 - 76.
279. Vig B., Sterners K., Paveletz N. Centromere structure and function in neoplasia // *Cancer Genetic & Cytogenetics*. - 1989. - N 43. - P. 151 - 178.
280. Vojdani A., Mordechai E., Brautbar N. et al. Abnormal apoptosis and cell cycle progression in humans exposed to methyl tertiary-butyl ether and benzene contaminating water // *Human & Experimental Toxicology*. - 1997. - N 16(9). - P. 485 - 494.
281. Wang D., Johnston C., Barros D'Sa A. et al. Expression of apoptosis-suppressing gene *bcl-2* in human carotid body

- tumors // *Journal of Pathology*. – 1997. – N 183(2). – P. 218 – 221.
282. Watanabe Y., Nurse P. Cohesin Rec8 required for reductional chromosome segregation at meiosis // *Nature*. – 1999. – V. 400. – P. 461 – 464.
283. Westhorpe F. G., Straight A. F. The Centromere: Epigenetic Control of Chromosome Segregation during Mitosis // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2015. – V. 7(1). – P. 015818.
284. Wetzler M., Dodge R. K., Mrózek K. et al. Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: the cancer and leukemia Group B experience // *Blood*. – 1999. – N 93 (11). – P. 3983 - 3993.
285. Wodzinski M. A., Watmore A. E., Lilleyman J. S. et al. Chromosomes in childhood acute lymphoblastic leukemia: karyotypic patterns in disease subtypes // *Journal Clinic Pathology*. – 1991. – V. 44(1). – P. 48 – 51.
286. Woo J. S., Alberti M. O., Tirado C. A. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update // *Experimental Hematology & Oncology*. – 2014. – N 3 (16). – P. 66 – 86.
287. Xia Y. Brown L., Tsan J. et al. The translocation t(1;14) (p34;q19) in human T-cell leukemia: chromosome breakage 25 kilobase pairs down-stream of the TAL1 protooncogene // *Genes, Chromosomes & Cancer*. – 1992. – N 4(3). – P. 211 – 216.
288. Yigou Hu Acute lymphoblastic leukemia: genetic events and molecular signatures // *American journal of biomedical sciences*. – 2014. – V. 6(14). – P. 238 – 253.
289. Yunis J. J., Oken M. M., Kaplan M. E., Ensrud K. M., Howe R. B., Theologides A. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma // *The New England Journal of Medicine*. – 1982. – N 307. – P. 1231 - 1236.

290. Zamoyska R., Basson A., Filby A., Legname G., Lovatt M., Seddon B. The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation // *Immunological Reviews*. - 2003. - N 191. - P. 107 - 18.
291. Zhang P., Wong C., Liu D. et al. p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step // *Genes & Development*. - 1999. - N 13(2). - P. 213 - 224.
292. Zhang S. Centromere spreading and out-of-phase chromatid separation in Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma // *Cancer Genetic & Cytogenetics*. - 1986. - N 23(3). - P. 211 - 217.
293. Zhong S., Salomoni P., Pandolfi P. P. The transcriptional role of PML and the nuclear body // *Nature Cell Biology*. — 2000. — V. 2, N 5. — P. 85 — 90.
294. Zollino M., Leone G., Sica S. et al. Trisomy 4 in acute lymphoblastic leukemia // *Cancer Genetic & Cytogenetic*. - 1993. - N 65(2). - P. 115 - 119.
295. Zou H., McGarry T. Identification of a variable sisters-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis // *Science*. - 1999. - V. 285, N 5426. - P. 418 - 422.
296. Zou H., Huang P., Robertson L. et al. High molecular weight DNA fragmentation: a critical event in nucleoside analogue-induced apoptosis in leukemia cells // *Clinical Cancer Research*. - 1995. - V. 1, N 2. - P. 1005 - 1013.
297. Zou D., Ma M. S., Zhao R. Z., Li M. Y. Centromere separation and centromeric aberrations in ovarian tumors // *Cancer Genetic & Cytogenetics*. - 1995. - V. 80, N 1. - P. 63 - 65.
298. Zuerman J. Roberts syndrome. I. Cytological evidence for a disturbance in chromatid pairing // *Clinical Genetic*. - 1979. - V. 16, N 6. - P. 441 - 447.

299. Zuhao Y., Hsu T., Wang R. Exaggerated precocious centromere separation in cells of a human breast cancer line treated with a green tea extract // International Journal Oncology. – 1998. – V. 12, N 3. – P. 617 – 620.
300. Zuu Y., Hsu T., Wang R. et al. Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukemia results of MRC UK ALL X // British Journal Hematology. – 1997. – V. 99, N 1. – P. 93 – 100.

Наукове видання

Сіренко Артур Геннадійович

Центромера та онкогенез

Комп'ютерний макет – *Сіренко А. Г.*

Коректор – *Сіренко У. С.*

На першій сторінці малюнок художника

Гарібіяна Г. А.

Підписано до друку 19.06.2020. Формат 60x84/16

Папір офсетний. Друк цифровий.

Гарнітура «Times New Roman». Ум. друк. арк. 17,44

Наклад 100. Зам. № 123 від 25.06.2020.

Друк: Видавництво «Територія друку»

76008, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 128

тел.: (0342) 58-04-32, +38 050 540 30 64