

УДК 612.119

DOI: 10.18413 /2409-0298-2015-1-3-5-10

Скоркина М.Ю.
Тикунова Т.С.
Беляева С.С.

**МОРФОЛОГИЯ КЛЕТОК
КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА
ПРИ РАЗВИТИИ
МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ
ПРОЦЕССОВ В СИСТЕМЕ
КРОВИ**

Скоркина Марина Юрьевна, доцент кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции, доктор биологических наук, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,

ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия; *E-mail: skorkina@bsu.edu.ru*

Тикунова Татьяна Сергеевна, заместитель главного врача по организационно-методической работе, кандидат медицинских наук,

Белгородская областная клиническая больница им. Св. Иоасафа, ул. Некрасова, 8/9, г. Белгород, 308007, Россия; *E-mail: tikunovats@bokb.ru*

Беляева Светлана Сергеевна, Заведующая гематологическим отделением областной больницы, кандидат медицинских наук,

Белгородская областная клиническая больница им. Св. Иоасафа, ул. Некрасова, 8/9, г. Белгород, 308007, Россия; *E-mail: S-belyaeva@yandex.ru*

Аннотация

В выполненном исследовании изучены морфология клеток крови и костного мозга при развитии миелопролиферативных процессов в системе крови. Установлено, что развитие острого миелобластного типа лейкоза характеризуется появлением в периферическом русле незрелых миелоидных предшественников лейкоцитов, для которых характерно протекание моноцентрических форм митоза и амитоза, что приводит к накоплению патологических форм и высокой гетерогенности клеточной популяции устойчивой к химиотерапии. Объем недифференцированных миелобластов в периферической крови был снижен как до лечения, так и после лечения соответственно на 32% и 20% ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичными параметрами клеток, заселяющих костный мозг. Однако увеличение размеров данного типа клеток, циркулирующих в кровотоке и заселяющих костный мозг после лечения, указывает на приобретение ими генетической гетерогенности и сохранения ими высокой степени злокачественности.

Ключевые слова: острый миелобластный лейкоз, объем клетки, морфология клетки, недифференцированный миелобласт.

UDC 612.119

DOI: 10.18413 /2409-0298-2015-1-3-5-10

*Skorkina M.Yu.
Tikunova T.S.
Belyaeva S.S.*

***THE MORPHOLOGY OF BLOOD
CELLS AND BONE MARROW
DURING THE DEVELOPMENT
OF MYELOPROLIFERATIVE
PROCESS IN THE BLOOD***

Skorkina Marina Yuryevna, *Doctor of Biology, Associate Professor,*
Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia
E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

Tikunova Tatiana Sergeevna,
PhD in Medicine, Deputy Chief Doctor for Organizational and Methodical Work,
Belgorod St. Joasaph Regional Hospital,
8/9 Nekrasov St., Belgorod, 308007, Russia
E-mail: tikunovats@bokb.ru

Belyaeva Svetlana Sergeevna, *PhD in Medicine, Head of the Hematology Department,*
Belgorod St. Joasaph Regional Hospital,
8/9 Nekrasov St., Belgorod, 308007, Russia
E-mail: S-belyaeva@yandex.ru

АБСТРАКТ

The authors study the morphology of blood cells and bone marrow during the development of myeloproliferative processes in the blood. It was established that the development of acute myeloblastic leucosis was characterized by the appearance of immature leucocytes progenitors in the peripheral blood stream. The progenitors are characterized by monocentric types of mitosis and amitosis leading to the accumulation of pathological forms and high resistance to chemotherapy. The volume of undifferentiated myeloblasts in the peripheral blood was decreased both before and after the treatment by 32% and 20% ($p < 0.05$) respectively as compared with the same parameters of cells occupying the bone marrow. However, the increase in size of this type of cells circulating in the blood stream and occupying the bone marrow after treatment is evidence of their acquisition of the genetic heterogeneity and preservation of high degree of malignancy.

Key words: acute myeloblastic leucosis; a volume of cell; morphology of cell; undifferentiated myeloblast.

Лейкозы крови – системные опухолевые заболевания кроветворной ткани с гематогенным распространением незрелых бластных форм в другие органы и ткани. Следствием опухолевой трансформации клеток является изменение их морфофункциональных свойств [2]. Характерной особенностью миелобластного типа пролиферации является быстрая диссеминация (распространение) опухолевых клеток по системе кровотока. Вследствие этого, уже на ранних этапах заболевание приобретает системный характер [3, 6]. К настоящему моменту изучены различные аспекты жизненного цикла опухолевых клонов миелоидных клеток [7, 10]. Описаны многочисленные патологии митозов на стадии метафазы, что является ключевым механизмом нарастания генетической гетерогенности клеток на различных этапах бластомогенеза и высокой устойчивости клеток к химиотерапии [4]. Однако, несмотря на широкую изученность различных аспектов лейкоза крови [8, 9], в литературе отсутствуют данные о морфометрических параметрах бластных форм циркулирующих в периферическом русле и костном мозге. Исследование данного аспекта позволит спрогнозировать развитие и выбрать терапевтические подходы к лечению заболевания.

Цель работы заключалась в изучении морфологических особенностей форменных элементов крови, циркулирующих в костном мозге и периферической крови у больных острым миелобластным лейкозом до лечения и после него.

Материалы и методы исследования. Экспериментальная часть работы выполнена на базе кафедры экологии, физиологии и экологической эволюции НИУ «БелГУ», а также клинко-диагностической лаборатории областной клинической больницы Святого Иоасафа г. Белгорода.

Группа исследуемых больных включала 9 пациентов с различными формами лейкоза, проходивших морфоцитохимическую диагностику с одновременным взятием у данных больных пунктатов костного мозга и периферической крови. Среди обследованных больных были мужчины и женщины в возрасте от 48 до 56 лет. У всех больных диагноз острого лейкоза был установлен впервые, без предшествующего химиолучевого лечения или наличия миелодиспластического син-

дрома. В работе использованы образцы крови и костного мозга больных с острым миелобластным типом лейкоза (6 пациентов) до лечения и после прохождения стандартного курса химиотерапии.

Диагностику острого миелобластного типа лейкоза выполняли на основании алгоритма цитохимической диагностики, принятого в клинической онкогематологии [1]. Мазки крови и костного мозга готовили общепринятыми в гематологии способами. Окраску мазков осуществляли стандартными наборами красителей по Романовскому-Гимзе. Морфометрические параметры клеток крови измеряли на мазках с использованием комплекса аппаратно-программной визуализации морфологических препаратов, анализа и регистрации оптических и морфологических показателей «ВидеоТест» (СПб, регистрационное удостоверение №2912001070216102-04 от 16.02.2004). Используя программу «ВидеоТест-МастерМорфология», проводили видеозахват изображений, на которых определяли геометрические характеристики форменных элементов крови, измеряя средний габаритный размер 100 клеток с каждого мазка. Объем клеток бластных форм на мазках крови и костного мозга рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3,$$

где V – объем клетки, мкм³

r – радиус клетки, мкм.

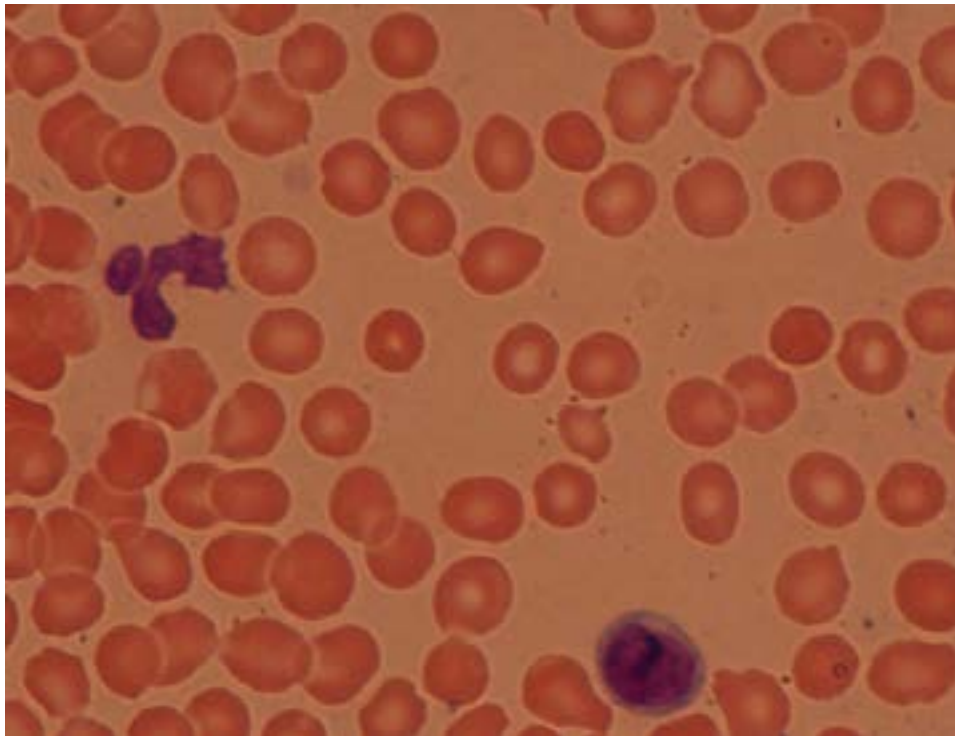
Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики.

Достоверность различий определяли с использованием t критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение.

В группе больных острым миелобластным типом лейкоза (ОМЛ) в периферическом русле выявлены как зрелые, так и недодифференцированные предшественники форменных клеток крови, в частности, зрелые формы представлены лимфоцитами (49%), незрелые – лимфобластами (13%), недифференцированными миелобластами (17,5%), нейтрофильными миелобластами (1%) и базофильными миелобластами (1%).

При развитии миелобластного лейкоза в периферической крови обнаружены картины моноцентрического митоза, который связан с нарушением деления центриолей (рис. 1).



*Рис. 1. Периферическая кровь больного ОМЛ:
стрелкой указан бласт с моноцентрическим типом митоза*

*Fig.1. Peripheral blood of a patient with AML:
the arrow indicates the blast with monocentric type of mitosis*

Активная пролиферация бластных форм установлена в костном мозге (рис. 2 а), кроме того выявлены клетки в состоянии апоптоза и делящиеся путем амитоза (рис. 2б).

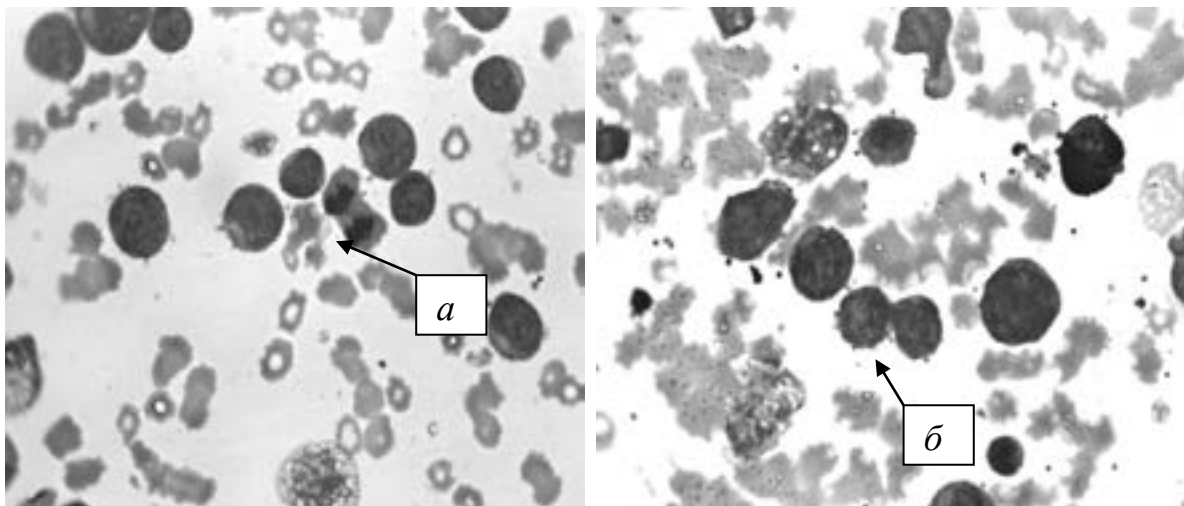


Рис. 2. Костный мозг больного ОМЛ: а – делящийся бласт (стадия анафазы); б – амитоз.

Fig.2 Bone marrow of a patient with AML: a – fissile blast (stage of anaphase); b – amitosis.

По данным литературы, возникновение картин патологического митоза ведет к накоплению хромосомных мутаций и является одним из механизмов возникновения анеуплоидии и нарастания генетической гетерогенности клеточных популяций [5].

Объем лимфобластов в периферическом русле на 15% ($p < 0,05$) превышал значения ана-

логичных клеток, локализованных в костном мозге. Причем после лечения в периферическом русле больных ОМЛ данного типа клеток не обнаружено, однако в костном мозге объем лимфобластов увеличился на 40% ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичными типами клеток костного мозга до лечения (таблица).

Объем лимфоцитов достоверно не различался между исследуемыми группами больных ОМЛ.

Объем недифференцированных миелобластов в крови до лечения был снижен на 32% ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичными показателями этого типа клеток, локализованных в костном мозге, однако после лечения снижение в объеме клеток между костным мозгом и периферической кровью составило 20%

($p < 0,05$). Сравнивая показатели объема клеток между больными до лечения и после лечения установлено, что после химиотерапии как в костном мозге, так и в крови объем недифференцированных миелобластов увеличился соответственно на 15,5% и 23% ($p < 0,05$), что указывает на приобретение клетками генетической гетерогенности и сохранения ими высокой степени злокачественности.

Таблица

Объем форменных элементов крови (мкм³) больных лейкозом

Table

The volume of blood cells (mkm³) in patients with leucosis

Тип клеток	ОМЛ первичный		ОМЛ пролеченный	
	Костный мозг	Кровь	Костный мозг	кровь
Лимфобласт	492,0±21,7	567,1±30,9 ^L	814,9±19,8*	-
Лимфоцит	207,7±31,3	228,7±13,6	252,8±64,7	215,6±19,9
Миелобласт недифференцированный	1160,9±52,9	881,3±23,9 ^L	1374,1±107,1*	1143,5±89,5*
Миелобласт нейтрофильный	1439,2±91,0	1540,2±34,5	-	265,1±11,6*
Миелобласт базофильный	-	1512,7±71,2	1269,3±59,8	581,7±10,7* ^L

Примечание: * - статистически достоверные различия между значениями в группах больных лейкозом после лечения по сравнению со значениями до лечения по критерию Стьюдента при $p < 0,05$. ^L – статистически достоверные различия между значениями клеток, локализованных в костном мозге по сравнению с клетками, циркулирующими в периферической крови по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Кроме того, высокая мутагенность и устойчивость к терапии ранних предшественников миелоидного ряда подтверждается фактом отсутствия нейтрофильных миелобластов в костном мозге после лечения. Однако в периферической крови они выявлены, их объем был снижен на 83% ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичными типами клеток до лечения.

Базофильные миелобласты отсутствовали у пациентов больных ОМЛ в костном мозге до лечения, однако после лечения они были идентифицированы. В периферической крови они присутствовали в обеих исследуемых группах, однако их объем после лечения существенно снизился на 61,5% ($p < 0,05$).

Заключение

Развитие миелопролиферативного процесса в системе крови сопровождается появлением в периферическом русле недифференцированных миелобластов, для которых характерны

патологические формы протекания митоза. Уменьшение объема недифференцированных миелобластов в 1,3 раза в русле по сравнению с формами, заселяющими костный мозг на фоне протекания патологических типов митоза указывает на высокую гетерогенность популяции опухолевых клеток до лечения. Однако после лечения объем недифференцированных миелобластов, циркулирующих в русле был снижен в 1,2 раза по сравнению с аналогичными формами костного мозга, что указывает на устойчивость злокачественных клонов клеток к химиотерапии и как следствие отсутствие дальнейшей дифференцировки миелобластов и популяции более зрелых предшественников – нейтрофильных миелобластов в костном мозге. Однако после лечения, несмотря на отсутствие нейтрофильных миелобластов в костном мозге, в периферической крови они сохраняли свою жизнеспособность.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е. Лабораторная диагностика лейкозов. М.: Триада, 2004. 148с.
2. Accessing the cytoskeletal system and its elements in C6 glioma cells and astrocytes by atomic force microscopy / Zhou D., Jiang R., Xu R., Gui Y. // Cell mol. Neurobiol. 2008. V. 28. P. 895-905.
3. Boeckx N., Renard M., Uyttebrak A. Acute monocytic leukemia with histiocytic features // Br.J. Haematol. 2007. V. 137 (1). P. 2.
4. Blasts from elder acute myeloid leukemia patients are characterized by low level of culture and drug-induced apoptosis / Willman S.M., Cooper J.J., Appelbun F.R., Willman C.L., Kopecky K., Banker D.E. // Leuk. Red. 2011. V. 25 (1). P.23-32.
5. Cheng Y., Wang Y., Wang H. Cytogenetic profile of de novo acute myeloid leukemia a study based on 1432 patients in a single institution of Chine // Leukemia. 2009. V. 23. P. 1801-1806.
6. Cheng R., Yuan Y., Chen T. Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cell from acute myeloid leukemia patients // Mol. Med. Rep. 2014. V. 9 (1). P. 293-298.
7. Clinical and laboratory features of seven patients with acute myeloid leukemia (AML) – M2/M3 and elevated myeloblasts and abnormal promyelocytes / He G., Wang C., Li R., Tan H., Chen F. // Cancer Cell International. –2014. V. 12. P. 111.
8. Grisolano J.L., O’Neal J., Cain J., Tomasson M.H. An activated receptors tyrosine kinase, TEL/PDGFbetaR, cooperates with AML1/ETO to induce acute myeloid leukemia in mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 9506-9511.
9. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia / Kern W., Haferlach C., Haferlach T., Schnitt ger S. // Cancer. 2008. V. 112. P. 4-16.
10. Schlenk R.F., Dohnor K., Krauter J. Mutations and treatment out come in cytogenetically normal acute myeloid leukemia // N. Eng. J. Med. 2008. V. 358. P. 1909-1918.

REFERENCES:

1. Lugovskaya S.A., Morozova V.T., Pochtar M.E. Laboratory diagnostics of leukemia. M.: Triada, 2004. 148 p.
2. Zhou D., Jiang R., Xu R., Gui Y. // Cell mol. Neurobiol. V. 28 (2008): 895-905.
3. Boeckx N., Renard M., Uyttebrak A. // Br.J. Haematol. V. 137 (1) (2007): 2.
4. Willman S.M., Cooper J.J., Appelbun F.R., Willman C.L., Kopecky K., Banker D.E. // Leuk. Red. V. 25 (1) (2011): 23-32.
5. Cheng Y., Wang Y., Wang H. // Leukemia. V. 23 (2009): 1801-1806.
6. Cheng R., Yuan Y., Chen T. // Mol. Med. Rep. V. 9 (1) (2014): 293-298.
7. He G., Wang C., Li R., Tan H., Chen F. // Cancer Cell International. V. 12 (2014): 111.
8. Grisolano J.L., O’Neal J., Cain J., Tomasson M.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. N. V. 100 (2003): 9506-9511.
9. Kern W., Haferlach C., Haferlach T., Schnitt ger S. // Cancer. V. 112 (2008): P. 4-16.
10. Schlenk R.F., Dohnor K., Krauter J. // N. Eng. J. Med. V. 358 (2008): 1909-1918.