

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ОСОБЕННОСТИ ТОПОГРАФИИ ПОВЕРХНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ
ПРИ РАЗВИТИИ МИЕЛОБЛАСТНОГО ТИПА ПРОЛИФЕРАЦИИ В
СИСТЕМЕ КРОВИ**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 06.04.01 Биология
очной формы обучения, группы 07001315
Рядинской Анны Григорьевны

Научный руководитель

д.б.н., проф. Скоркина М.Ю.

БЕЛГОРОД 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	8
1.1. Показатели крови при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови	8
1.1.1. Острый миелобластный лейкоз	8
1.1.2. Хронический миелобластный лейкоз.....	10
1.2. Структурно-функциональная организация мембран лимфоцитов	12
1.3. Функциональная активность бластов больных лейкозом.....	14
Глава 2. Материалы и методы исследования	19
2.1. Забор крови и условия эксперимента.....	19
2.2. Общий и дифференциальный анализ крови.....	19
Глава 3. Результаты исследования	22
3.1. Гематологические показатели крови	22
3.2. Особенности рельефа поверхности лимфоцитов доноров	23
3.3. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ОМЛ.....	24
3.4. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ХМЛ.....	27
Глава 4. Обсуждение результатов исследования	31
Выводы	33
Список использованной литературы.....	34

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одной из актуальных проблем современной молекулярно-клеточной физиологии является изучение особенностей топографии поверхности в норме и при развитии патофизиологических состояний в организме. Топография (рельеф) поверхности представляет собой совокупность структурных образований на поверхности клетки, которые задействованы в целом спектре физиологических реакций, например, в передаче сигнала в ядро и регуляции метаболических процессов (Poch et al., 2004; Goffarts et al., 2006), изменении формы клетки и распластывании ее на субстрате (Hodges, 1970), передаче сигнала соседним клеткам при метастазировании опухолей (Федченко, 2007).

В литературе представлены данные, согласно которым, одним из механизмов развития злокачественной миелопролиферации является дефект микроокружения, подтверждением чему служат качественные и количественные изменения клеток стромы костного мозга с нарушением продукции цитокинов, которые выявлены у больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) (Schmitt-Graef et al., 2000). Кроме того, развитие миелобластного типа пролиферации сопровождается иммунологическими нарушениями, а именно, снижением киллерной функции лимфоцитов, что приводит к утрате контроля над опухолевыми клонами клеток (Bourgeois et al., 2003).

Несмотря на дисфункцию клеточного звена иммунитета при развитии миелобластного типа пролиферации в системе крови, описанного в ряде работ (Антонов, Козлов, 2004; Плотникова, 2015), в кровотоке циркулирует популяция лимфоцитов, которые являются ключевыми участниками адаптивного иммунитета, однако их морфофизиология остается мало изученной. Известно, что клеточная поверхность и компетентность рецепторного аппарата лимфоцитов (Chaplin, 2010) играют важную роль в развитии иммунных реакций. В связи с чем, важным аспектом является

изучение топографии клеточной поверхности лимфоцитов, которая, в свою очередь подвергается значительному влиянию со стороны химиотерапии, так как в кровотоке циркулируют эндогенные токсины, выбрасываемые в русло после стандартных схем лечения, используемых в клинике (Титов, 2004).

Степень разработанности темы исследования. В научной литературе представлены многочисленные исследования посвященные изучению цитогенетических аномалий опухолевых клонов миелоидной линии. Доказано, что первично при злокачественном миелобластном типе пролиферации поражается стволовая кроветворная клетка или ее ранние миелоидные предшественники (Tehranchi et al., 2003). Установлено, что основными молекулярными аномалиями являются генные aberrации и мутации (Ichikawa, Kurokawa, 2009). Ключевую роль в патофизиологии острого миелоидного типа лейкоза отводят mTOR сигнальному пути, обеспечивающему выживание и рост опухолевых клеток за счет инициации aberrаций (Altman et al., 2011; Chen et al., 2010; Min et al., 2003). В развитии хронических форм миелобластного типа лейкоза исследователи отводят ведущую роль в возникновении реципрокной хромосомной транслокации Т (9; 22) (q34; q11) в популяции стволовых клеток. Данная транслокация между длинными плечами 9 и 22 хромосомы приводит к укорочению плеча хромосомы 22, и известна в литературе как филадельфийская хромосома (Ph). Молекулярным последствием данного события является формирование химерного гена BCR/ABL на хромосоме 22 и ABL/BCR на хромосоме 9 (Sales, Vefaille, 2002).

В результате молекулярно-генетических перестроек в системе крови появляются дефектные миелобласты, которые накапливаются в костном мозге и, последующий их выход в периферическое русло, инициирует дисфункцию гуморальных и клеточных звеньев иммунитета (Антонов, Козлов, 2004). В системе крови больных миелобластным типом лейкоза описано снижение уровня В-лимфоцитов, ослабление способности моноцитов к фагоцитозу, изменения адгезии и хемотаксиса фагоцитов, нарушение функции

нейтрофилов (Ma et al., 2003). Несмотря на широкий спектр исследований, посвященных изучению различных аспектов миелопролиферативных заболеваний, представленных в литературе к настоящему моменту, остаются практически не изученными особенности рельефа поверхности и свойства лимфоцитов при повреждении миелоидной линии кроветворения, а вместе с тем, они являются практически «единственной» линией иммунной защиты, в условиях повреждения основных звеньев врожденного иммунитета.

С учетом вышесказанного была сформулирована цель исследования и поставлены основные задачи.

Цель исследования: изучить топографию (рельеф) поверхности лимфоцитов при развитии острого и хронического миелобластного типа пролиферации в системе крови.

Задачи исследования:

1. Изучить гематологические показатели системы крови в группе пациентов с острым и хроническим типом миелопролиферации.
2. Изучить особенности рельефа поверхности лимфоцитов в норме.
3. Исследовать морфологию поверхности лимфоцитов в группе пациентов с острым типом миелобластного лейкоза на стадии лечения и ремиссии.
4. Исследовать морфологию поверхности лимфоцитов в группе пациентов с хроническим типом миелобластного лейкоза на стадии ремиссии и лечения.
5. Проанализировать особенности рельефа поверхности на стадии лечения и ремиссии при развитии острого и хронического типов миелобластного лейкоза.

Объект исследования – лимфоциты периферической крови людей.

Предмет исследования – изучение морфологии поверхности лимфоцитов в норме и при развитии в системе крови злокачественных миело-пролиферативных процессов.

Методы исследования. В работе использованы методы исследования общего и дифференциального анализа крови с использованием автоматического гематологического анализатора Beckman Coulter LH500 (Франция, 2010). Топографию поверхности лимфоцитов изучали на атомно-силовом микроскопе Integra Vita (Зеленоград, 2009) в режиме полу-контактного сканирования. Обработку, полученных сканов и измерение морфометрических параметров лимфоцитов осуществляли с использованием компьютерной программы Gwyddion-2.46.win32. Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли методами вариационной статистики.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выполненное исследование содержит новые сведения об особенностях морфологии клеточной поверхности лимфоцитов в норме и при развитии злокачественных миелопролиферативных процессов в системе крови. Теоретическая значимость работы связана с изучением патофизиологических механизмов и поиском ранних маркеров лимфоцитов, которые первыми вступают в контакт с опухолевыми клетками. Полученные данные имеют практическое значение в оценке реакций клеточной поверхности лимфоцитов на различных стадиях протекания злокачественных процессов в системе крови, а также в диагностике ранних изменений и поиске ключевых маркеров начинающихся злокачественных пролиферативных процессов.

Структура работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, 4 глав с описанием полученных результатов исследования, обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 43 страницах машинописного текста, включает 5 таблиц и 8 рисунков. Список литературы включает в себя 81 наименование, из которых 40 отечественных и 41 иностранных источников.

Публикации: по теме выпускной квалификационной работы опубликовано 2 статьи в научных журналах:

1. Шамрай, Е. А. Упруго-эластические свойства и рельеф поверхности лимфоцитов больных острым и хроническим миелобластным лейкозом /

Е. А. Шамрай, А. Г. Рядинская, С. С. Беяева // Научный результат. Сер. Физиология. – 2016. – Т. 2, № 1. – С. 23-26.

2. Рядинская, А. Г. Рельеф поверхности лимфоцитов в условиях острого миелобластного типа пролиферации клеток крови / А. Г. Рядинская, О. В. Сыроватская // Научный результат. Сер. Физиология. – 2017. – Т. 3, № 1. – С. 14-18.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Показатели крови при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови

1.1.1. Острый миелобластный лейкоз

Острый миелобластный лейкоз - это клональное опухолевое заболевание кроветворной ткани, развивающееся из клетки предшественницы миелопоэза, следствием которого становится блок дифференцировки и бесконтрольная пролиферация незрелых миелоидных клеток (Testa, Riccioni, 2007; Сладкова, 2013). Процесс начинается в костном мозге с образования незрелых белых кровяных телец (лейкоцитов) (Зуховицкая, Фиясь, 2015). В результате развития ОМЛ больные клетки вытесняют здоровые из костного мозга, что приводит к нехватке зрелых дифференцированных форменных элементов крови. Это служит причиной развития анемии, геморрагического синдрома и иммунодефицитного состояния (Buonamici et al., 2003; Insall, Machesky, 2009).

По классификации FAB (French-American-British) ОМЛ подразделяется на восемь подвариантов (Lorzbach, 2004):

- 1) M0 (с минимальной дифференцировкой) – бласты экспрессируют антигены миелоидной линии;
- 2) M1 (недифференцированный) – крайне незрелые предшественники миелобластов;
- 3) M2 (с дифференцировкой) – доминируют миелобласты и промиелоциты;
- 4) M3 (промиелоцитарный) – доминируют промиелоциты;
- 5) M4 (меломоноцитарный) – миело- и моноцитарная дифференцировка, моноцитоз;
- 6) M5 (моноцитарный) – доминируют монобласты и моноциты;
- 7) M6 (эритролейкоз) – многоядерные, мегалобластоподобные эритробласты, есть миелобласты;

8) M7 (мегакариоцитарный) – доминируют бласты мегакариоцитарной линии (Рулина и др., 2010).

По данным Клочковой Г.Н. (2016) для группы больных острыми миелобластным типом лейкоза характерна лейкопения. Общее число лейкоцитов снижено на 61,5% ($p < 0,05$), число моноцитов и базофилов увеличено соответственно на 41,5% и 74,7% ($p < 0,05$), на фоне сниженного числа нейтрофилов, эозинофилов и лимфоцитов по сравнению с контролем. Гематологические показатели системы крови при остром миелобластном лейкозе характеризуются снижением числа тромбоцитов, то есть наблюдается тромбоцитопения. Концентрация гемоглобина и показатели гематокрита снижены по сравнению с нормой.

Развитие лейкоза сопровождается накоплением в костном мозге и периферической крови клеточных субпопуляций с измененными молекулярными механизмами передачи внутриклеточного сигнала (Соколов и др., 2012). Опухолевая трансформация клеток крови характеризуется изменением их морфологии и функции. Выявлены многочисленные патологии митозов на стадии метафазы, что является ключевым механизмом нарастания генетической гетерогенности клеток крови на различных этапах бластомогенеза (Флейшман, 2007; Флейшман, 2002; Vaccarani, Dreyling, 2010).

В исследованиях Владимирова С.Г. (2012) были приведены лабораторные показатели больных с впервые выявленным ОМЛ. Результаты определения протромбинового индекса (ПТИ) у больных обеих групп были достоверно ниже нормы, однако большинство значений этих выборок не выходило за пределы нормальных колебаний. Между группами индексы отрицательной корреляции АПТВ (активированного парциального тромбопластинового времени) не отклонялись от нормы. Оба показателя имели значимую корреляцию с количеством тромбоцитов: ПТИ – положительную, а АПТВ – отрицательную. Это свидетельствует о снижении общего коагуляционного потенциала (Плотникова, 2015). Концентрация фибриногена в среднем превышала норму у всех обследованных на 2,0 г/л.

Отмечается, что фибриноген, на котором сходятся пути свертывания крови (тромбоцитарный и коагуляционный), относится и к белкам острой фазы. Повышение его уровня происходит в процессе воспалительного ответа организма на заболевание или инфекцию. Как и С – реактивный белок (СРБ), фибриноген был значимо выше нормы. У подавляющего большинства обследованных лиц отмечено повышение уровней растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) — маркеров тромбинемии. У больных выявлена зависимость: чем выше лейкоцитоз, тем сильнее подавлен нормальный миелопоэз и иммунитет, следовательно, такие люди более подвержены инфекциям (Владимиров и др., 2012).

1.1.2. Хронический миелобластный лейкоз

Хронический миелобластный лейкоз (ХМЛ) или хронический миелоидный (миелоцитарный) лейкоз – это опухолеподобное заболевание крови, которое характеризуется высоким развитием промежуточных клеток лейкоцитарного ряда (гранулоцитов) (Виноградова и др., 2008; Сладкова, 2015). В Российской Федерации в настоящее время насчитывается около семи тысяч больных ХМЛ. Число первичных больных в год составляет приблизительно 1:100 000 взрослого населения. Болеют преимущественно люди среднего возраста: пик заболеваемости приходится на возраст 30-50 лет, около 30 % составляют больные старше 60 лет (Абдулкадыров и др., 2013; Просекова и др., 2013; Куцев и др., 2010).

В основе развития данного заболевания лежит увеличение числа наиболее молодых и зрелых клеток, которые подавляют развитие эритроцитарного и тромбоцитарного ростков (Kantarjian, 1988; Druker et al., 2001;).

Хронический миелобластный лейкоз – медленно развивающийся вид лейкоза, при котором организм продуцирует неконтролируемое число лейкоцитов всех уровней созревания (Mrozek et al., 2001). Он возникает в результате реципрокной транслокации (взаимного обмена частями) хромосом 9 и 22. Вследствие этого обмена хромосома 22 имеет укороченное длинное

плечо и называется филадельфийской (Ph-хромосома) (Barnes, 2003). Таким образом, происходит транслокация на хромосоме 22 и образуется химерный ген BCR-ABL при слиянии части гена ABL с хромосомы 9 с оставшейся на хромосоме 22 частью гена BCR (Chiou et al., 2005). Химерный ген BCR-ABL кодирует образование белка BCRABL, в котором тирозинкиназа ABL постоянно активирована в связи с отменой ее физиологической супрессии, осуществляемой в норме, оставшейся на хромосоме 9 части гена ABL (Сарсенгалиева, 2010). Эта постоянная повышенная активность тирозинкиназы BCR-ABL вызывает активацию сигнальных путей (Домрачева и др., 2007), отвечающих за пролиферацию клеток миелоидного ряда (Антонов, Козлов, 2004), что приводит к увеличенной продукции лейкоцитов всех стадий созревания (Vaccarani, Dreyling, 2010).

Опухолевая трансформация, приводящая к усиленной пролиферации, подавлению апоптоза, выходу незрелых предшественников в кровь связана с появлением в клетке тирозинкиназы BCR-ABL (Branford, 2012), а появление новых хромосомных aberrаций, мутации генов приводит к прогрессии болезни из хронической фазы (ХФ) в фазы акселерации (ФА) и бластного криза (БК). У подавляющего большинства пациентов (около 80–85 %) ХМЛ диагностируется в ХФ. В остальных случаях ХМЛ выявляют на этапе ФА (около 15 %) или в БК (около 5 %) (Druker et al., 2001).

По данным Рябчиковой Н.Р. (2014) у пациентов больных ХМЛ в общем анализе крови при постановке диагноза наблюдали следующие изменения, достоверно отличающиеся от показателей здоровых лиц: снижение концентрации гемоглобина до $111,2 \pm 1,7$ г/л ($p < 0,001$) и числа эритроцитов до $3,8 \pm 0,1 \cdot 10^{12}/л^{-1}$ ($p < 0,01$), выраженный лейкоцитоз ($127,3 \pm 8,4 \cdot 10^9/л$, $p < 0,001$), тромбоцитоз ($383,9 \pm 20,2 \cdot 10^9/л$, $p < 0,001$). В лейкоцитарной формуле выявлен резкий сдвиг влево до бластов с наличием всех промежуточных форм: промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, отсутствующих в группе контроля, увеличение палочкоядерных ($17,8 \pm 0,8\%$) и снижение сегментоядерных ($36,1 \pm 1,2\%$) форм лейкоцитов ($p < 0,001$), увеличение

процента базофилов до $2,3 \pm 0,2\%$ ($p < 0,01$) и эозинофилов до $3,3 \pm 0,1\%$ ($p < 0,001$) (базофильно-эозинофильная ассоциация). При анализе миелограммы выявлено достоверное увеличение числа бластов до $5,65 \pm 0,42\%$ ($p < 0,01$), промиелоцитов до $11,35 \pm 0,65\%$ ($p < 0,001$) относительно группы контроля. Так же, наблюдалось снижение относительного уровня Т-лимфоцитов, CD^{4+} -клеток, цитотоксических лимфоцитов и повышение относительного и абсолютного содержания В-лимфоцитов и абсолютного числа лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR антиген (Смирнова, 2012).

1.2. Структурно-функциональная организация мембран лимфоцитов

Мембраны играют ключевую роль в структурной организации и функционировании всех клеток. Они формируют внутриклеточные компартменты, с помощью которых происходит разделение содержимого отсеков и окружающей их среды. Мембраны участвуют в регуляции всех связей и взаимодействий, которые осуществляются между наружной и внутренней сторонами компартментов (Геннис, 1997).

Основными компонентами мембран являются белки и липиды, соотношение между которыми варьирует – от 20% (по массе сухого вещества) белка в миелине до 80% в митохондриях. На долю углеводов приходится около 10% массы мембран, при этом они всегда входят в состав гликолипидов и гликопротеидов (McMahon, Gallop, 2005).

Основу структурной организации плазматической мембраны лимфоцита составляет липидный бислой с асимметрично встроенными белками. Липидные молекулы, являясь важными структурными и функциональными компонентами мембраны клетки, поддерживают конформационное состояние мембранных ферментов, регулируют подвижность и активность внутри мембранных белков, обеспечивают в клетке селективную проницаемость и работу рецепторного аппарата. Нормальное функционирование плазматической мембраны зависит от ее микровязкостных свойств, определяемых, глав-

ным образом, состоянием липидной фазы (Геннис, 1997; Mavoungou et al., 1997).

Гликокаликс определяется как внешний примембранный слой плазматической мембраны (Mestel et al., 1998). Он состоит в основном из гликозаминогликанов, в составе которых находятся молекулы гиалуроновой кислоты. Его количество зависит от числа ореолообразующих клеток среди общего числа лейкоцитов и от состояния организма, из крови которого выделяют лейкоцитную массу (Голованов, Bauer, 1997; Bauer, 1994).

Гликокаликс принимает активное участие в большинстве внеклеточных функций (иммунологических) от начала контакта клетки с внешними агентами и заканчивая формированием электрического заряда на поверхности плазматической мембраны (физические функции) (Slivinsky et al., 1997; Голованов, Долтчинкова, 2002).

Нарушение физиологического состояния клетки сопровождается определенными изменениями в липидном спектре биомембран, приводящими к изменениям метаболизма белков мембран (Воробьев и др., 1995; Воробьев и др., 1999; Воробьев и др., 2000). Повышенная деформация злокачественных раковых клеток, по сравнению с доброкачественными, облегчает их миграцию и инвазию. Однако изменение клеток лимфоцитов наоборот способствует непроходимости через сосуды организма, что может вызвать аномальную внутрисосудистую агрегацию клеток и их сгущение в сосудистой сети (Zheng et al., 2015).

По результатам Казаряна П.А. (2011) в лимфоцитарных мембранах больных лейкозом повышен уровень цитотоксичных и мембранолитических лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) и коэффициент соотношения ЛФХ/фосфатидилхолины (ФХ), что указывает на преобладание процессов деградации глицерофосфолипидов. При этом резко снижается коэффициент соотношения ФХ/фосфатидная кислота (ФК), что свидетельствует о подавлении процессов фосфатидогенеза (Казарян и др., 2011).

Множественное понижение коэффициента соотношения ФХ/ФК в мембранах лимфоцитов крови больных обусловлено значительным уменьшением содержания ФХ и накоплением промежуточных продуктов липогенеза, в том числе и основных промежуточных продуктов метаболизма фосфатидов-глицеридов. Выявлено значительное понижение уровня АТФ на фоне повышения содержания аденозинмонофосфата (АМФ) и аденозиндифосфата (АДФ) (Казарян и др., 2011).

В основе выявленных изменений лежит развивающаяся при этом гипоксия с усилением анаэробного окисления углеводов и подавлением процессов окислительного фосфорилирования. Понижение уровня основного энергетического субстрата может привести к развитию энергетического криза (Galoyan, 1997; Galoyan, 2004). Накопление содержания АДФ и АМФ указывает на нарушение их метаболизма (Казарян и др., 2011). Таким образом, лимфопролиферативные заболевания (ЛПФЗ) характеризуются нарушениями липидных и белковых компонентов биомембран.

1.3. Функциональная активность бластов больных лейкозом

В основе лабораторной диагностики лейкозов лежит выявление в периферической крови, костном мозге и спинномозговой жидкости бластных клеток (Зуева и др., 2004). Бласты – это недифференциальные клетки, которые характеризуются быстрым делением. Они бывают злокачественные (анаплазированные) и нормальные, которые всегда содержатся в костном мозге (менее 5%) (Wen, Kesari, 2008).

Одним из ключевых моментов развития опухолевого процесса является понижение противоопухолевого иммунного надзора (Владимирская, 2007). Работы по изучению Т-клеточного и НК-клеточного противолейкемического иммунного ответа ведутся по нескольким направлениям: установление на бластных клетках специфических лейкоэмических маркеров (лейкозоассоциированных антигенов), распознаваемых Т-клетками, изучение количественного и качественного состава резидуальных лимфоцитов –

эффекторов костного мозга, выявление причин неэффективности противолейкемического клеточного иммунитета (Колбацкая, Тупицын, 2012).

Появление трансформированной клетки, которая может дать начало опухолевому росту, связано с адаптацией одной или нескольких нормальных клеток соответствующего уровня дифференцировки к действию повреждающих факторов, тогда как значительная часть нормальных клеток в этих условиях погибает (Sarkadi et al., 2006).

Среди внутриклеточных и внеклеточных механизмов сохранения больных клеток жизнеспособности выделяют:

- выведение из клетки во внеклеточное пространство неизмененных чужеродных веществ (предохраняет внутриклеточные структуры от повреждения);
- секвестрация химических соединений внутри цитоплазматических везикул;
- изменение состояния или нарушение образования внутриклеточных компонентов, которые являются мишенями для повреждающих агентов;
- окисление с помощью системы монооксигеназ липофильных токсических соединений с образованием более водорастворимых производных;
- конъюгация с помощью ферментных систем токсических соединений с глутатионом, глюкуроновой кислотой с образованием менее токсичных водорастворимых соединений, которые легче выводятся из организма;
- повышение активности ферментов, обеспечивающих метаболизм ксенобиотиков внутри клеток;
- повышение репарации ДНК;
- нарушение обнаружения поврежденной ДНК;
- пребывание клетки вне фазы клеточного цикла, наиболее уязвимой для повреждения;

- расположение клеток в местах, малодоступных для повреждающих факторов;
- дезактивация токсических соединений в других органах;
- взаимодействие с другими клетками, экстраклеточным матриксом, ростовыми факторами (цитокинами);
- сочетанное действие нескольких внутриклеточных защитных систем;
- способность к взаимозамещению некоторых систем клеточной резистентности;
- формирование перекрестной (множественной, плеiotропной) устойчивости клеток (Свирновский, 2014).

Эффективность функционирования внутриклеточных защитных систем определяется тканевой специфичностью, генетическим фоном организма и сохранностью координированной регуляции различных жизненно важных процессов в клетке (Васильев, 1997). Интенсивность и длительность повреждающего воздействия определяет запуск программы клеточной гибели, что может привести к возникновению диспластических и апластических процессов. Это приводит к включению программы иммортализации клетки без сохранения специфической клеточной функции, что завершается развитием опухолевого процесса (Заридзе, 2004).

Важным свойством неопластических клеток является ослабление в них индукции апоптоза (Заридзе, 2004; Datta et al., 1999). Уход от него резко повышает жизнеспособность такой клетки, делает ее менее чувствительной к факторам противоопухолевого иммунитета и терапевтическим воздействиям (рис. 1).



Рис. 1. Важнейшие свойства неопластической клетки, приобретаемые в ходе опухолевой прогрессии и обеспечивающие злокачественный рост (Заридзе, 2004)

Неотъемлемой частью опухолевых клеток является изменение их морфологии. В основе морфологических нарушений лежат взаимосвязанные между собой изменения цитоскелета, адгезионных взаимодействий клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом (Васильев, Гельфанд, 2006). Локомоторный фенотип в неопластических клетках сильно утрирован, что позволяет различать по морфологии опухолевую клетку от движущейся нормальной. Данные нарушения предопределяют приобретение неопластическими клетками двух свойств, лежащих в основе злокачественного роста: способность к инвазии (проникновению в окружающие здоровые ткани) (Васильев, Гельфанд, 2006; Yamazaki et al., 2005) и способность к метастазированию (Mehlen, Puisieux, 2006; Steeg, 2006) – образованию вторичных очагов опухолевого роста (Enver et al., 1998; Копнин, 2000).

Одним из главных маркеров на поверхности мембраны опухолевых клеток является CD44. Этот поверхностный гликопротеин опосредует клеточную адгезию, миграцию и наведение гемопоэтических раковых клеток. По данным Quere R. (2011) рецидивирующие лейкозные клетки ограничены популяцией клеток, экспрессирующих высокие уровни адгезии CD44.

Следовательно, при развитии миелобластного типа пролиферации в системе крови, полная ремиссия не может быть достигнута с первого раза, так как происходящие при этом мутации в дополнительных протоонкогенах способствуют перепроизводству молекулы адгезии CD44, что делает лейкозные клетки устойчивыми к инактивации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Забор крови и условия эксперимента

Исследования выполнены на кафедре биологии в 2014-2017 гг. Института инженерных технологий и естественных наук НИУ «БелГУ».

Забор периферической крови осуществляли из локтевой вены на базе клинико-диагностической лаборатории областной клинической больницы города Белгорода с участием специализированного медицинского персонала. Пробы крови собирали в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ, содержащие сухую ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота, предотвращающая свёртывание крови путём блокирования ионов кальция) в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови (0,006843 моль/литр).

2.2. Общий и дифференциальный анализ крови

На базе клинико-диагностической лаборатории областной клинической больницы г. Белгорода им. Св. Иосафа выполняли общий и дифференциальный анализ крови с использованием автоматического гематологического анализатора Beckman Coulter LH500 (Франция, 2010). Для скрининга отбирали пробы крови больных острым миелобластным типом лейкоза (n=40), хроническим миелобластным типом лейкоза (n=35). В качестве контроля использовали кровь практически здоровых людей (n=50). На анализаторе выполняли следующий спектр анализов: подсчет общего числа эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, лейкоформулы, определение гемоглобина, гематокрита, среднего содержания гемоглобина в 1 эритроците, среднюю концентрацию гемоглобина в расчете на 1 л крови, средний объем эритроцита и тромбоцита.

2.3. Методика определения особенностей рельефа поверхности мембран

Особенности рельефа мембран изучали на атомно-силовом микроскопе. В выполненном экспериментальном исследовании отбирали пробы

крови пациентов с острым миелобластным лейкозом на стадии лечения (n=9) и ремиссии (n=2), и хроническим миелобластным лейкозом на стадии лечения (n=2) и ремиссии (n=2). Контролем служили пробы крови здоровых людей (n=25). Подготовку препаратов для сканирования осуществляли следующим образом: осуществляли разделение проб крови на лейкоциты и эритроциты путём центрифугирования в течение 10 минут при 5000 об./мин; полученную надосадочную жидкость и лейкоцитарное кольцо отбирали, затем центрифугировали 10 минут при той же скорости; получали суспензию лейкоцитов. Готовили мазки из суспензии лейкоцитов на стеклянных обезжиренных подложках. Рельеф мембран изучали в режиме на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; производитель NT-MDT, Зеленоград, 2009) с частотой развёртки порядка 0,6-0,8 Гц. Для сканирования использовали кантилевер серии NSG03 с радиусом закругления 10 нм. Из каждой пробы сканировали не менее 15 клеток. Таким образом общее число исследованных клеток составило: в группе больных ОМЛ на стадии лечения n=135, на стадии ремиссии – n=30; в группе больных ХМЛ на стадии лечения n=30, на стадии ремиссии – n=30, в контроле – n=375.

С целью выявления особенностей топографии клеточной поверхности лимфоцитов проводили подсчёт числа морфологических образований и измеряли их линейные размеры. На полученных сканах строили кривые профиля участков поверхности размером 3x3 мкм, на которых измеряли габаритные размеры и подсчитывали число глобулярных выступов, а также углублений (рис. 2).

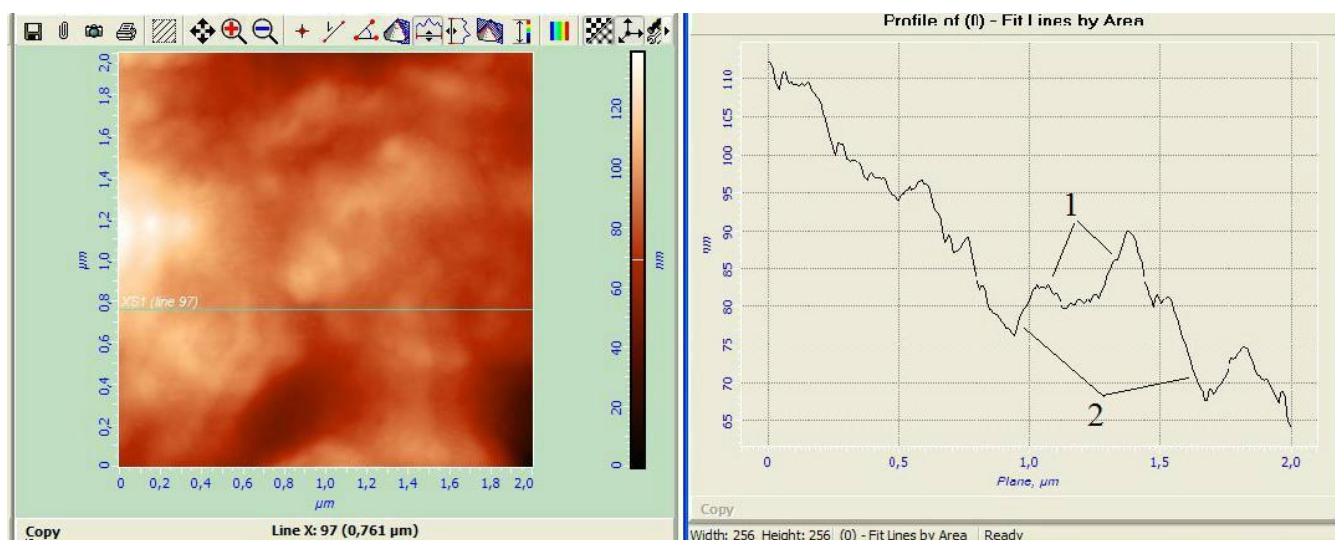


Рис. 2. АСМ-изображение и вид профиля поверхности лимфоцита вдоль линии сканирования: 1- глобулярные выступы, 2 –углубления
По оси абсцисс – длина участка (мкм), по оси ординат – высота структур (нм).

Морфометрические параметры клеток (диаметр – d , мкм, площадь поверхности – S , мкм², объём – V , мкм³) измеряли с помощью программы Gwyddion-2.46.win32 (USA, 2011).

Экспериментальные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета анализа «Microsoft Excel» на персональном компьютере. Статистический анализ полученных данных проведён с использованием критерия Стьюдента для 5%-го уровня значимости, в связи с нормальным распределением выборки.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Гематологические показатели крови

В результате выполненных экспериментов в группе больных ОМЛ число лейкоцитов сократилось на 56,8% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Выявлены изменения в лейкоформуле, в частности: число палочкоядерных нейтрофилов достоверно сократилось в 6,5 раз, а сегментоядерных форм в 2 раза, число эозинофилов, базофилов, лимфоцитов и моноцитов возросло соответственно в 4, 14, 3 и 3 раза по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1

Гематологические показатели системы крови больных острым и хроническим миелобластным лейкозом

Показатели	Доноры (n=50)	Острый миело- бластный лейкоз (n=40)	Хронический миелобластный лейкоз (n=35)
WBC, 10^9 л^{-1}	9,51±0,27	4,11±0,60*	4,29±0,90*
Нейтрофилы, %	17,52±0,90	2,68±0,50*	30,60±1,70*
Палочкоядерные сегментоядерные	55,48±1,27	35,60±1,90*	25,40±1,50*
Эозинофилы, %	1,84±0,42	7,12±0,30*	12,00±0,20*
Базофилы, %	0,85±0,01	11,80±0,50*	0,53±0,03
Лимфоциты, %	34,35±1,82	111,30±10,20*	25,40±0,40
Моноциты, %	8,42±1,22	22,10±0,80*	7,70±0,70
RBC, 10^{12} л^{-1}	4,00±0,50	3,92±0,10	4,02±0,50
Нб, г/л	135,30±1,40	121,40±5,30*	116,10±0,80*
Нт, %	38,90±1,20	36,10±0,60	34,50±0,80
MCV, фл	90,40±0,50	91,80±2,30	86,30±1,20
MCH, пг	31,60±0,40	30,90±0,80	28,90±0,20
MCHC, г/л	330,80± 3,50	336,40±2,00	334,50±0,20
PLT, 10^9 л^{-1}	378,30±28,50	228,20±29,30*	319,50±34,00*
MPV, фл	8,50±1,30	10,20±0,60	9,30±0,30

* статистическая значимость достоверности различий по сравнению со здоровыми пациентами по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечания: WBC – число лейкоцитов, RBC – количество эритроцитов, Нб – концентрация гемоглобина, Нт – гематокрит. MCV – средний объем эритроцита, MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, PLT - число тромбоцитов, MPV – средний объем тромбоцита.

В группе больных ХМЛ число лейкоцитов сократилось на 55% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В лейкоформуле выявлено увеличение числа палочкоядерных форм в 1,8 раза, уменьшение сегментоядерных клеток в 2,2

раза, увеличение числа эозинофилов в 6,5 раз по сравнению с контролем. Число базофилов, лимфоцитов и моноцитов находилось в пределах недостоверных различий с контролем.

Концентрация гемоглобина в группах больных ОМЛ и ХМЛ была снижена соответственно на 10% ($p < 0,05$) и 14% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Остальные показатели системы красной крови в исследуемых группах пациентов с ОМЛ и ХМЛ были в пределах, характерных для здоровых людей.

В группах больных ОМЛ и ХМЛ число тромбоцитов уменьшилось на 40% ($p < 0,05$) и 15% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контролем.

Таким образом, у пациентов больных ОМЛ наблюдается нормохромия, лейкопения, регенеративный ядерный сдвиг вправо, эозинофильный лейкоцитоз и моноцитоз. ХМЛ характеризуется нормохромией, лейкопенией, регенеративным ядерным сдвигом влево и эозинофильным лейкоцитозом.

3.2. Особенности рельефа поверхности лимфоцитов доноров

В результате проведённых исследований были выявлены особенности топографии поверхности клеток доноров. В норме лимфоциты имеют округлую форму, большую часть клетки занимает ядро, выступающее над поверхностью. Площадь поверхности лимфоцитов составляет $151,48 \pm 23,44$ $\mu\text{м}^2$, объём равен $128,87 \pm 12,35$ $\mu\text{м}^3$, а диаметр – $6,30 \pm 0,10$ $\mu\text{м}$ (рис. 3).

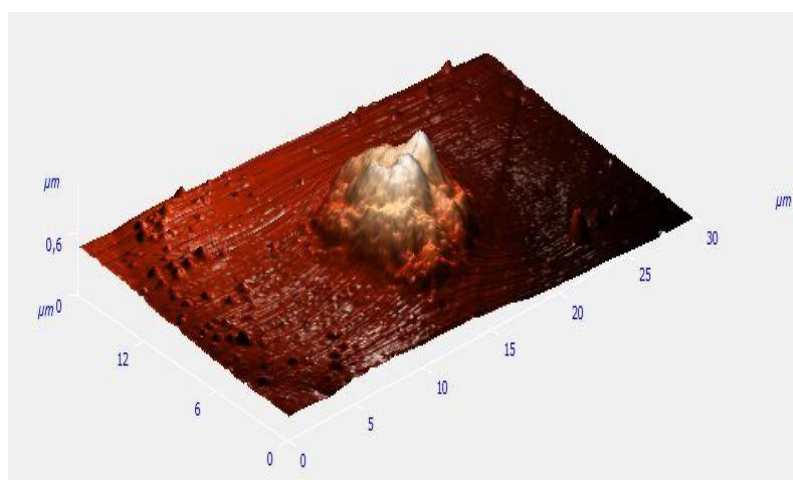


Рис. 3. АСМ – изображение лимфоцита донора

Рельеф поверхности представлен многочисленными морфологическими образованиями в виде глобулярных выступов, чередующихся с различного рода инвагинациями (рис. 4).

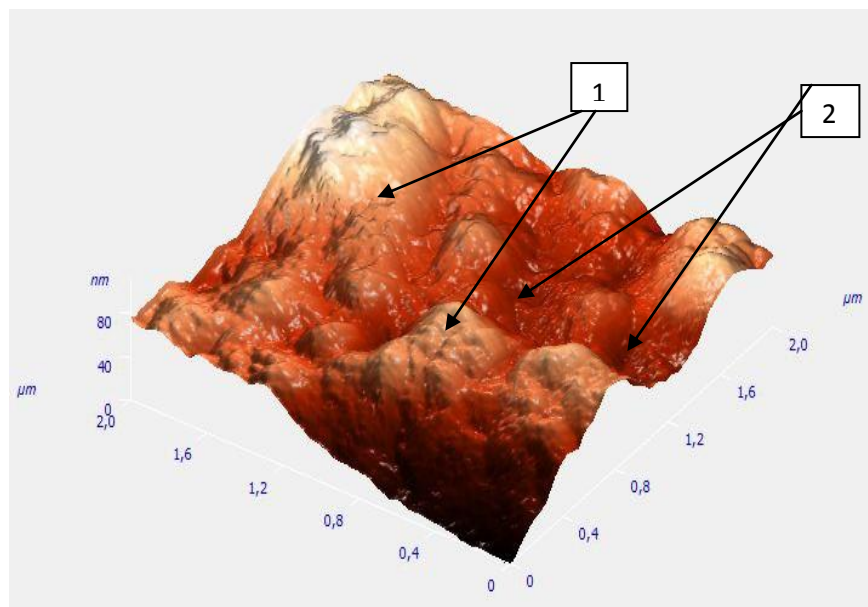


Рис. 4. Рельеф поверхности лимфоцита донора: 1 – глобулярные выступы, 2 – углубления

Высота и ширина глобулярных выступов соответственно $41,3 \pm 3,7$ нм и $15 \pm 0,9$ нм, их количество – $36 \pm 0,9$. Число углублений в мембране составило $18 \pm 1,1$, их габаритные размеры были в пределах: глубина - $17,3 \pm 0,6$ нм, – диаметр - $221,8 \pm 24,0$ нм.

3.3. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ОМЛ

По данным исследования в группе больных ОМЛ на стадии лечения площадь поверхности лимфоцитов и объём снизились соответственно на 46% ($p < 0,05$) и 69% ($p < 0,05$), а в стадии ремиссии - на 38,5% ($p < 0,05$) и 62% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Диаметр лимфоцитов находился в пределах недостоверных различий с контролем (табл. 2).

Геометрические параметры лимфоцитов больных ОМЛ

Параметры	Контроль (n=375)	ОМЛ	
		лечение (n=135)	ремиссия (n=30)
S, мкм ²	151,48±23,44	81,37±3,22 ^{ab}	93,22±3,94 ^a
V, мкм ³	128,87±12,35	39,82±2,95 ^{ab}	48,99±2,35 ^a
D, мкм	6,30±0,10	6,70±0,15	6,63±0,35

a - статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов доноров и больных лейкозом по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

b - статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов больных на стадии лечения по сравнению со стадией ремиссии по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечания: S – площадь поверхности клетки, V – объем клетки, D – диаметр клетки.

Сравнивая геометрические параметры лимфоцитов больных ОМЛ на разных стадиях течения болезни видно, что площадь поверхности клеток на стадии лечения снижена на 12% ($p < 0,05$), а их объем уменьшен на 18,7% ($p < 0,05$) по сравнению с данными в ремиссии (рис. 5).

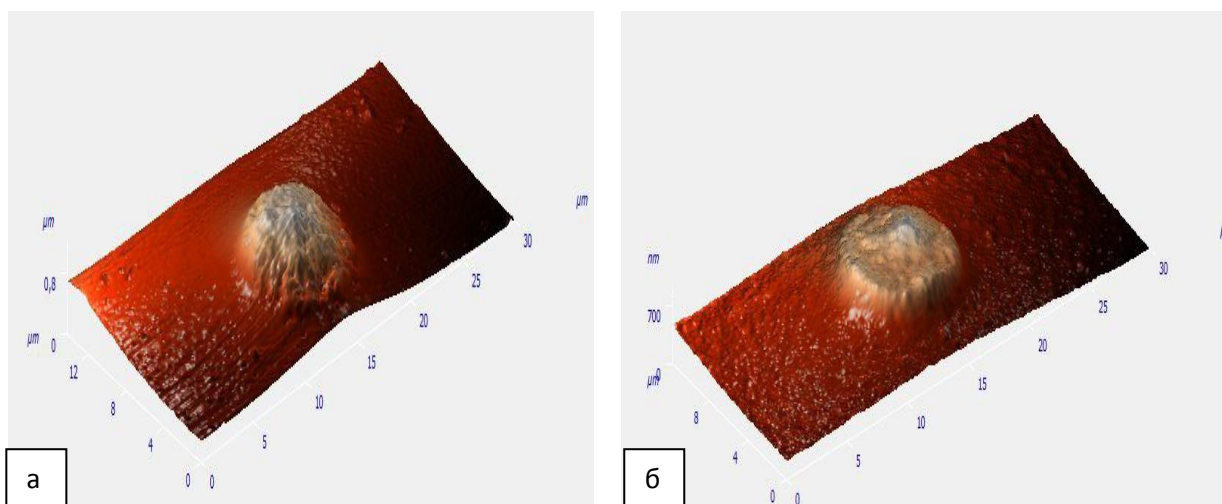


Рис. 5. ACM – изображение лимфоцита больного ОМЛ: а – на стадии лечения, б – на стадии ремиссии

У больных ОМЛ на стадии лечения число глобулярных выступов уменьшилось на 72,5% ($p < 0,05$), на фоне снижения их высоты и увеличения ширины соответственно на 33,4% и 425,4% ($p < 0,05$) по сравнению с контро-

лем. Глубина инвагинаций плазмалеммы увеличились на 23% ($p<0,05$), диаметр снизился на 63% ($p<0,05$), а их число – сократилось на 41,5% ($p<0,05$) по сравнению с контролем (табл. 3).

Таблица 3

Рельеф поверхности лимфоцитов

Параметры		Контроль (n=375)	ОМЛ	
			лечение (n=135)	ремиссия (n=30)
Глобулярные выступы	высота, нм	41,30±3,70	27,52±2,96	32,25±2,95
	ширина, нм	15,00±0,90	78,81±21,66 ^a	112,35±4,14 ^a
	Число	36,00±0,90	9,89±1,80 ^a	7,84±3,95 ^a
Углубления (инвагинации)	глубина, нм	17,30±0,60	21,28±1,98 ^b	39,49±5,56 ^a
	диаметр, нм	221,80±24,00	82,46±21,71 ^a	62,19±2,64 ^a
	Число	18,00±1,10	10,52±1,80 ^a	7,81±1,20 ^a

a - Статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов доноров и больных лейкозом по критерию Стьюдента при $p<0,05$.

b - Статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов больных на стадии лечения по сравнению со стадией ремиссии по критерию Стьюдента при $p<0,05$.

У больных ОМЛ на стадии ремиссии число глобулярных выступов снизилось на 78,2% ($p<0,05$), на фоне снижения их высоты и увеличения ширины соответственно на 22% и 649% ($p<0,05$) по сравнению с контролем. Глубина инвагинаций плазмалеммы увеличилась на 128% ($p<0,05$), диаметр уменьшился на 72% ($p<0,05$), а их число сократилось на 57% ($p<0,05$) по сравнению с контролем.

У больных острой формой миелобластного лейкоза на стадии лечения и ремиссии снизилось общее число глобулярных выступов и впадин. Рельеф поверхности был более сглажен за счет уменьшения высоты глобулярных структур, при этом их ширина увеличилась на стадии лечения в 5,2 раза, а в состоянии ремиссии - в 7,5 раз по сравнению с контролем (рис. 6).

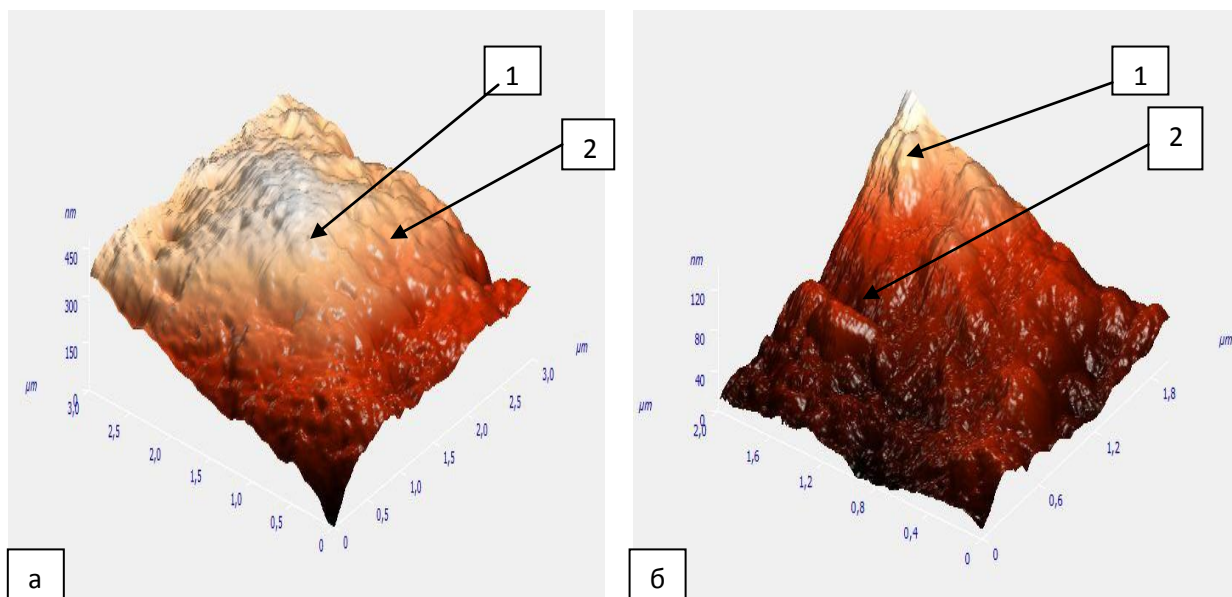


Рис. 6. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ОМЛ: а – на стадии лечения, б – на стадии ремиссии: 1 – глобулярные выступы, 2 – углубления

На стадии ремиссии глубина инвагинаций возросла в 2,3 раза, а их диаметр уменьшился в 3,5 раза по сравнению с контролем. При лечении наблюдали увеличение глубины инвагинаций, при уменьшении диаметра углублений в 2,7 раза по сравнению с контролем.

Сравнивая особенности топографии поверхности на стадии лечения и ремиссии ОМЛ установлено, что глубина инвагинаций на стадии лечения уменьшилась на 46% ($p < 0,05$) по сравнению с данными в ремиссии. Остальные параметры рельефа поверхности лимфоцитов находились в пределах недостоверных различий.

3.4. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ХМЛ

По данным исследования в группе больных ХМЛ на стадии лечения площадь поверхности лимфоцитов и объём снизились соответственно на 45% ($p < 0,05$) и 68% ($p < 0,05$), а в стадии ремиссии - на 60% ($p < 0,05$) и 33% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Диаметр лимфоцитов находился в пределах недостоверных различий с контролем (табл. 4).

Геометрические параметры лимфоцитов больных ХМЛ

Параметры	Контроль (n=375)	ХМЛ	
		лечение (n=30)	ремиссия (n=30)
S, мкм ²	151,48 ± 23,44	83,64 ± 6,56 ^a	60,60 ± 4,00 ^a
V, мкм ³	128,87 ± 12,35	41,44 ± 3,87 ^a	42,81 ± 7,01 ^a
D, мкм	6,30 ± 0,10	6,40 ± 0,37	5,81 ± 0,24

а - статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов доноров и больных лейкозом по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

б - статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов больных на стадии лечения по сравнению со стадией ремиссии по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Примечания: S – площадь поверхности клетки, V – объем клетки, D – диаметр клетки.

Сравнивая геометрические параметры лимфоцитов больных ХМЛ на разных стадиях течения болезни можно сделать вывод, что площадь поверхности, объем и диаметр клеток находились в пределах недостоверных различий с контролем (рис. 7).

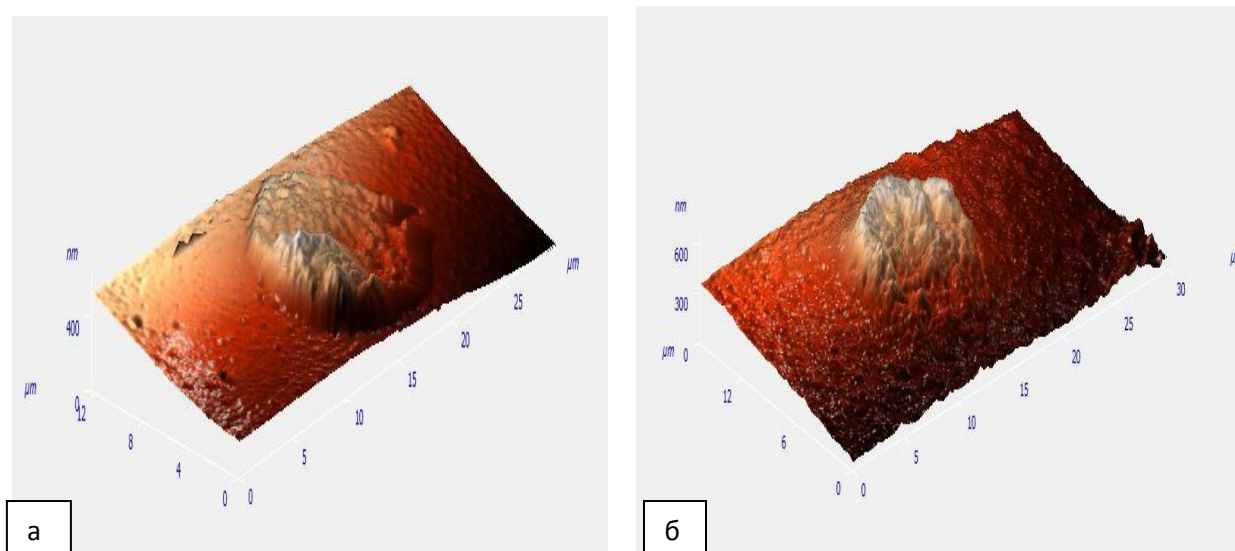


Рис. 7. АСМ – изображение лимфоцита больного ХМЛ: а – на стадии лечения, б – на стадии ремиссии

У больных ХМЛ на стадии лечения число глобулярных выступов уменьшилось на 94% ($p < 0,05$), на фоне снижения их высоты и увеличения

ширины соответственно на 54% и 984% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Глубина инвагинаций и диаметр плазмалеммы снизились соответственно на 12% ($p < 0,05$) и 45% ($p < 0,05$), а их число – сократилось на 88% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 5).

Таблица 5

Рельеф поверхности лимфоцитов

Параметры		Контроль (n=375)	ХМЛ	
			лечение (n=30)	ремиссия (n=30)
Глобулярные выступы	высота, нм	41,30±3,70	18,96±1,02 ^{ab}	139,82±9,38 ^a
	ширина, нм	15,00 ± 0,90	162,58±5,30 ^{ab}	95,14±4,38 ^a
	Число	36,00± 0,90	2,04±0,23 ^{ab}	5,60±0,51 ^a
Углубления (инвагинации)	глубина, нм	17,30±0,60	15,24±0,63 ^{ab}	75,28±2,62 ^a
	диаметр, нм	221,80±24,00	122,75±3,20 ^{ab}	152,93±7,00 ^a
	Число	18,00± 1,10	2,12±0,23 ^{ab}	4,50±0,50 ^a

а - Статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов доноров и больных лейкозом по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

б - статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов больных на стадии лечения по сравнению со стадией ремиссии по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

У больных ХМЛ на стадии ремиссии число глобулярных выступов снизилось на 84% ($p < 0,05$), на фоне увеличения их высоты и ширины соответственно на 238,5% и 534% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Глубина инвагинаций плазмалеммы увеличилась на 335% ($p < 0,05$), диаметр уменьшился на 31% ($p < 0,05$), а их число сократилось на 75% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 8).

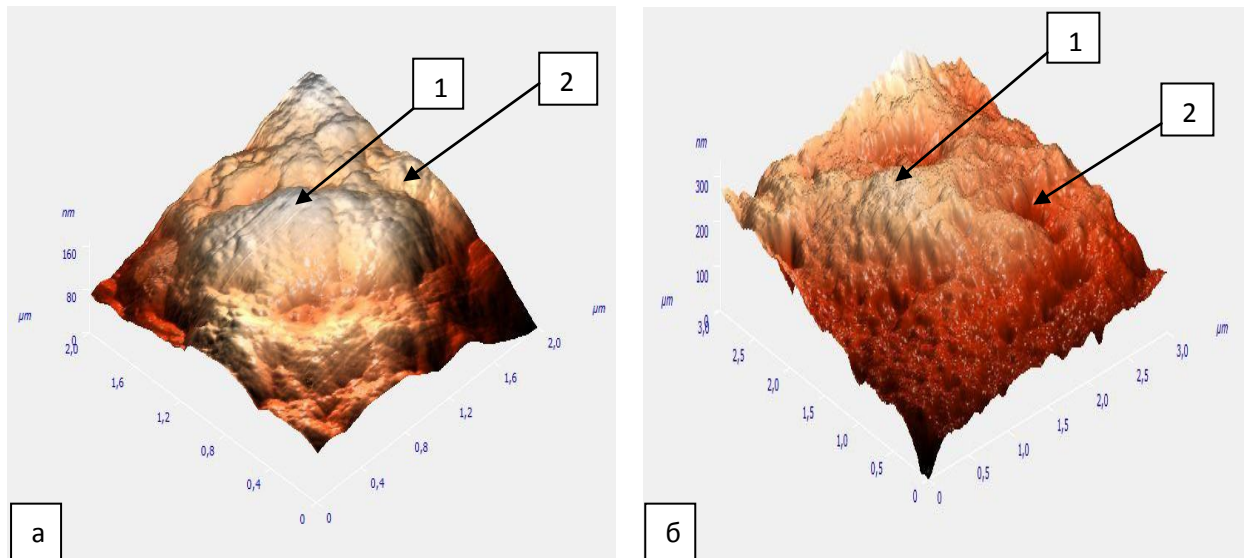


Рис. 8. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ХМЛ: а – на стадии лечения, б – на стадии ремиссии: 1 – глобулярные выступы, 2 – углубления

На стадии ремиссии глубина инвагинаций возросла в 4,4 раза, а их диаметр уменьшился в 1,5 раза по сравнению с контролем. При лечении наблюдали уменьшение глубины инвагинаций и диаметра углублений соответственно в 1,2 и 1,8 раз.

Анализируя рельеф поверхности на различных стадиях протекания ХМЛ установлено, что высота глобулярных структур на стадии лечения снизилась на 86% ($p < 0,05$), а их ширина - увеличилась на 41,5% ($p < 0,05$). Глубина и диаметр инвагинаций на стадии лечения снизились на 80% ($p < 0,05$) и 20% ($p < 0,05$) по сравнению с данными в ремиссии.

Достоверным является уменьшение числа выступов и инвагинаций на стадии лечения соответственно на 63,5% и 53%.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуя гематологические показатели крови, нами было установлено, что для пациентов больных ОМЛ и ХМЛ характерна нормохромия, лейкопения, эозинофильный лейкоцитоз. Однако особенностью лейкоформулы при развитии ОМЛ является наличие моноцитоза и регенеративного ядерного сдвига вправо. Для больных ХМЛ характерен регенеративный ядерный сдвиг влево. Выявленные особенности согласуются с данными литературы, согласно которым при развитии ОМЛ наблюдается лейкопения (Клочкова и др, 2016). При развитии ХМЛ ряд авторов приходит к мнению, что первыми симптомами в выявлении этого заболевания является лейкоцитоз (Смирнова, 2012) и преобладание палочкоядерных форм нейтрофилов над сегментоядерными (Рябчикова и др., 2014).

С использованием метода атомно-силовой микроскопии изучены особенности топографии поверхности лимфоцитов доноров, больных ОМЛ и ХМЛ. Морфологические образования на клеточной поверхности представлены глобулярными выступами и углублениями мембраны.

Для лимфоцитов миелобластного типа пролиферации характерно уменьшение числа глобулярных выступов и впадин, и снижение объема и площади поверхности на всех стадиях протекания заболевания. Согласно данным литературы, эти изменения являются следствием трансформации физиологического состояния клетки, которые приводят к нарушениям метаболизма белков мембран (Воробьев, 1999).

Рельеф поверхности при ОМЛ на всех стадиях развития был более сглажен за счет уменьшения высоты и глубины, и увеличения ширины и диаметра глобулярных структур. У больных ХМЛ на стадии лечения число глобулярных выступов уменьшилось, на фоне снижения их высоты и увеличения ширины по сравнению с контролем, а глубина инвагинаций и диаметр плазмалеммы снизились. На стадии ремиссии наблюдали увеличение высоты и ширины глобулярных выступов, а глубина инвагинаций плазмалеммы возросла на фоне уменьшения их диаметра.

По мнению Копнина Б.П. (2002) в основе морфологических нарушений неопластических клеток лежат взаимосвязанные между собой изменения цитоскелета, адгезионных взаимодействий клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом, которые выражаются в дезорганизации системы актиновых микрофиламентов. Активация G-белков семейства Ras и фосфатидилинозит-3-киназы (PI3K), находящихся на пересечении сигнальных путей от многих рецепторов, ведёт к повышению активности MAP-киназ – ключевых регуляторов клеточного цикла и малых ГТФаз семейства Rho, играющих центральную роль в реорганизации цитоскелета. Так же, для опухолевых клеток характерны генетические изменения, которые могут сопровождаться реорганизацией в морфологии лимфоцитов (Копнин, 2002).

Сравнивая геометрические параметры лимфоцитов больных ОМЛ на разных стадиях течения болезни видно, что площадь поверхности и объём клеток на стадии лечения снижены по сравнению с данными в ремиссии. У больных ХМЛ данные показатели находились в пределах недостоверных различий с контролем.

Анализ особенностей рельефа поверхности на различных стадиях заболевания при ОМЛ показал, что глубина инвагинаций на стадии лечения уменьшилась по сравнению с данными в ремиссии, а при ХМЛ высота, глубина и диаметр образований снизились, на фоне увеличения их ширины. Остальные параметры рельефа поверхности лимфоцитов находились в пределах недостоверных различий.

Можно предположить, что выявленные нами изменения на стадии лечения могут быть связаны со структурной дезорганизацией поверхностного рельефа лимфоцитов, что представляет собой один из вариантов ответной реакции клеток на химиотерапевтическое воздействие (Митин и др., 2014; Mehlen, 2006).

ВЫВОДЫ

1. Гематологические показатели крови при развитии острого и хронического типа миелопролиферации в системе характеризуются нормохромией эритроидного ростка кроветворения, лейкопенией и эозинофильным лейкоцитозом. Особенностью лейкоформулы при развитии ОМЛ является наличие моноцитоза и регенеративного ядерного сдвига вправо, а при развитии ХМЛ – регенеративного ядерного сдвига влево.

2. Лимфоциты доноров имеют округлую форму, большую часть клетки занимает ядро. Рельеф поверхности представлен многочисленными морфологическими образованиями в виде глобулярных выступов, чередующихся с различного рода инвагинациями.

3. Для лимфоцитов миелобластного типа пролиферации характерно уменьшение числа глобулярных выступов и впадин, снижение объёма и площади поверхности лимфоцитов на всех стадиях протекания заболевания.

4. Рельеф поверхности при развитии острого миелобластного типа пролиферации, как на стадии лечения, так и ремиссии более сглажен за счет уменьшения высоты и габаритных размеров глобулярных структур.

5. Развитие хронического миелобластного типа пролиферации в системе крови на стадии лечения характеризуется снижением высоты и увеличением ширины глобулярных выступов, а также снижением глубины и диаметра инвагинаций на поверхности плазмалеммы. Для стадии ремиссии характерно увеличение высоты и ширины глобулярных структур, глубины инвагинаций на фоне уменьшения их диаметра.

6. При развитии хронического миелобластного типа пролиферации на стадии лечения рельеф поверхности более сглажен по сравнению с ремиссией, за счет снижения числа, глубины и диаметра глобулярных структур на поверхности мембраны.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров, К. М. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и терапии хронического миелолейкоза [Текст] / К. М. Абдулкадыров, А. О. Абдулаев, Л. Б. Авдеева [и др.] // Вестник гематологии. – 2013. – Т. 9, № 3. – С. 1-42.
2. Антонов, В. Г. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы. Внеклеточные и клеточные механизмы общей иммунодепрессии и иммунной резистентности [Текст] / В. Г. Антонов, В. К. Козлов // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 8-19.
3. Васильев, Ю. М. Поисковые миграции клеток в нормальном развитии и в канцерогенезе [Текст] / Ю. М. Васильев, И. М. Гельфанд // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – С. 20-1013.
4. Васильев, Ю. М. Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток [Текст] / Ю. М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – Т. 5. – С. 5-20.
5. Виноградова, О. Ю. Организация терапии хронического миелолейкоза. Первый общероссийский регистр больных ХМЛ: анализ и перспективы [Текст] / О. Ю. Виноградова, А. Г. Туркина, Н. Д. Хорошко // Гематология и трансфузиология. – 2008. – Т. 53, № 5. – С. 54-58.
6. Владимиров, С. Г. Показатели гемостаза у больных острым миелоидным лейкозом в период манифестации заболевания [Текст] / С. Г. Владимиров, Л. Н. Тарасова, О. Ю. Скольская // Онкогематология. – 2012. – Т. 2, № 2. – С. 36-41.
7. Владимирская, Е. Б. Биологические основы лейкемогенеза [Текст] / Е. Б. Владимирская // Механизмы кроветворения и лейкемогенеза. – 2007. – № 5. – С. 67-85.
8. Воробьев, А. И. Критические состояния при гемобластозах (типичные формы и выживаемость в условиях отделения реанимации)

[Текст] / А. И. Воробьев, В. Г. Горолов, В. М. Гордецкий [и др.] // Терапевтический архив. – 1993. – Т. 7. – С. 3-6.

9. Воробьев, А. И. Принципы дифференциальной диагностики зрелоклеточных лимфатических опухолей [Текст] / А. И. Воробьев, Е. И. Яхина, Р. С. Самойлова // Терапевтический архив. – 1995. – Т. 67, №7. – С. 3-7.

10. Воробьев, А. И. «Старые» и «новые» опухоли лимфатической системы [Текст] / А. И. Воробьев, А. М. Кременецкая, Ю. Ю. Лорие [и др.] // Терапевтический архив. – 2000. – № 7. – С. 9-13.

11. Геннис, Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функция [Текст] / Р. Геннис. – Москва: Мир, 1997. – 314 с.

12. Голованов, М. В. К вопросу о биофизической теории электрофореза живых клеток [Текст] / М. В. Голованов, J. Bauer // Вестник Онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН. – 1997. – Т. 8, № 3. – С. 19-24.

13. Голованов, М. В. Структура и некоторые свойства гликокаликса лейкоцитов и лейкоэмических клеток [Текст] / М. В. Голованов, В. В. Долгичникова // Экспериментальные исследования. – 2002. – Т. 13, № 1. – С. 13-16.

14. Домрачева, Е. В. Роль цитогенетических исследований при лечении хронического миелолейкоза ингибиторами тирозинкиназ [Текст] / Е. В. Домрачева, Е. А. Асеева // Гематология и трансфузиология. – 2007. – Т. 2, № 52. – С. 25-28.

15. Заридзе, Д. Г. Канцерогенез [Текст] / Д. Г. Заридзе. – Москва : Медицина, 2004. – 580 с.

16. Зуева, Е. Е. Иммунофенотипическая диагностика острых лейкозов методом проточной цитометрии [Текст] / Е. Е. Зуева, Б. В. Афанасьев, А. А. Тотолян // Медицинская иммунология. – 2004. – Т. 6, № 1-2. – С. 9-24.

17. Зуховицкая, Е. В. Молекулярные механизмы лейкозогенеза и проблемы терапии острых лейкозов [Текст] / Е. В. Зуховицкая, А. Т. Фиясь. – Гродно : ГрГМУ, 2015. – 248 с.
18. Казарян, П. А. Мембранные аспекты патогенеза и терапии лимфопролиферативных заболеваний [Текст] / П. А. Казарян, С. С. Дагбашян, А. А. Галоян // Биохимия. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 59-68.
19. Клочкова, Г. Н. Гематологические показатели системы крови больных лейкозом [Текст] / Г. Н. Клочкова, С. С. Беляева, Т. С. Тикунова // Научный результат. – 2016. – Т. 2, № 2. – С. 34-40.
20. Колбацкая, О. П. Субпопуляции лимфоцитов костного мозга у больных острыми лейкозами в период диагностики заболевания [Текст] / О. П. Колбацкая, Н. Н. Тупицын // Иммуноонкология. – 2012. – № 2. – С. 77-82.
21. Копнин, Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза [Текст] / Б. П. Копнин // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 5-33.
22. Копнин, Б. П. Современные представления о механизмах злокачественного роста: сходства и различия солидных опухолей и лейкозов [Текст] / Б. П. Копнин // Клиническая онкогематология. – 2000. – Т. 5, № 3. – С. 5-33.
23. Куцев, С. И. Лекарственный мониторинг хронического миелолейкоза иматинибом [Текст] / С. И. Куцев, О. С. Оксенко, Е. Г. Кравченко // Онкогематология. – 2010. – № 3. – С. 1-9.
24. Митин, А. Н. Динамика восстановления Т-лимфоцитов после индукционного курса химиотерапии у пациентов с впервые выявленной множественной миеломой [Текст] / А. Н. Митин, М. М. Литвина, А. Д. Донецкова // Иммунология. – 2014. – Т. 35, № 4. – С. 209-214.
25. Плотникова, С. В. Прогностическая значимость маркеров системного воспаления при острых лейкозах [Текст] : дис. ... к-та мед. наук: 14.01.21/ С. В. Плотникова. – Уфа, 2015. – 143 с.

26. Просекова, Е. В. Клинико-лабораторная характеристика и оценка эффективности терапии хронического миелоидного лейкоза на территории приморского края [Текст] / Е. В. Просекова, В. С. Климов, В. А. Сабыныч [и др.] // Медицина и образование в Сибири. – 2013. – № 1. – С. 1-7.

27. Рулина, А. В. Активированные лейкозные онкогены AML1-ETO и C-KIT: роль в развитии острого миелоидного лейкоза и современные подходы к их ингибированию [Текст] / А. В. Рулина, П. В. Спирич, В. С. Просолов // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 349-386.

28. Рябчикова, Н. Р. Клинико-гематологическая характеристика больных хроническим миелолейкозом в республике Башкортостан [Текст] / Н. Р. Рябчикова, Г. Ш. Сафуанова, А. Б. Бакиров [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9, № 1. – С. 22-25.

29. Рядинская, А. Г. Рельеф поверхности лимфоцитов в условиях острого миелобластного типа пролиферации клеток крови [Текст] / А. Г. Рядинская, О. В. Сыроватская // Научный результат. Сер. Физиология. – 2017. – Т. 3, № 1. – С. 14-18.

30. Сарсенгалиева, А. К. Хронический миелолейкоз – современный взгляд на патогенетические механизмы, диагностику, лечение и мониторинг терапии [Текст] / А. К. Сарсенгалиева // Астраханский медицинский журнал. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 14-19.

31. Свирновский, А. И. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям как медико-биологическая проблема [Текст] / А. И. Свирновский // Клиническая практика и здоровье. – 2014. – № 4. – С. 1-24.

32. Сладкова, Е. А. Влияние митогенов на структуру и механические свойства плазмалеммы лимфоцитов больных ОЛЛ [Текст] / Е. А. Сладкова // Сборник материалов 17-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2013. – С. 453-454.

33. Сладкова, Е. А. Цитоархитектоника и свойства поверхности лимфоцитов у здоровых людей (доноров) и при развитии лимфопролиферативных процессов [Текст] : дис. ... канд. биол. наук: 03.03.04 / Е. А. Сладкова. – Белгород, 2015. – 172 с.

34. Смирнова, О. В. Хронический миелолейкоз – клинические иммунологические особенности у взрослых больных [Текст] / О. В. Смирнова // Клиническая медицина. – 2012. – Т. 2, № 3. – С. 185-189.

35. Соколов, А. Н. Долгосрочные результаты лечения острых миелоидных лейкозов у взрослых в многоцентровом клиническом исследовании ОМЛ [Текст] / А. Н. Соколов, Е. Н. Паровичникова, С. М. Куликов [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2012. – Т. 5, № 1. – С. 30-38.

36. Титов, В. Н. Экзогенные и эндогенные патологические факторы (патогенны) как причина воспаления [Текст] / В. Н. Титов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 5. – С. 3-10.

37. Федченко, Н. Н. Новые теоретические и патоморфологические подходы к проблеме метастазирования опухолей [Текст] / Н. Н. Федченко // Морфология. – 2007. – Т. 1, № 12. – С. 12-17.

38. Флейшман, Е. В. Возрастные особенности цитогенетических изменений при острых миелоидных лейкозах [Текст] / Е. В. Флейшман // Онкогематология. – 2007. – Т. 1, № 4. – С. 12-16.

39. Флейшман, Е. В. Клиническое значение хромосомного анализа при остром миелоидном лейкозе у детей [Текст] / Е. В. Флейшман // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 28-34.

40. Шамрай, Е. А. Упруго-эластические свойства и рельеф поверхности лимфоцитов больных острым и хроническим миелобластным лейкозом [Текст] / Е. А. Шамрай, А. Г. Рядинская, С. С. Беляева // Научный результат. Сер. Физиология. – 2016. – Т. 2 № 1. – С. 23-26.

41. Altman, J. K. Targeting mTOR for the treatment of AML [Текст] / J. K. Altman, A. Sassano, L. C. Platanius // New agents and new directions. *Oncotarget*. – 2011 – Vol. 2. – P. 510-517.
42. Baccarani, M. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [Текст] / M. Baccarani, M. Dreyling // *Ann. Oncol.* – 2010. – Vol. 21. – P. 165-167.
43. Barnes, P. J. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5 and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines [Текст] / P. J. Barnes // *The J. of Immunology*. – 2003. – Vol. 170. – P. 5359-5366.
44. Bauer, J. The negatives surface charge density of cells and their accrual state of differentiation or activation [Текст] / J. Bauer // *Cell Electrophoresis*. – 1994. – Vol. 96. – P. 267-280.
45. Branford, S. Monitoring after successful therapy for chronic myeloid leukemia [Текст] / S. Branford // *ASH Annual Meeting and Exposition*. – 2012. – Vol. 2. – P.105-110.
46. Bourgeois, E. Altered NK cell function in myelodysplastic syndromes [Текст] / E. Bourgeois, J. J. Kiladjiana, P. Fenaux [et al.] // *Leukemia Research*. – 2003. – Vol. 27, № 1. – P. 40.
47. Buonamici, S. The role of EVI1 in normal and Leukemia cells [Текст] / S. Buonamici, S. Chakraborty // *Blood cells*. – 2003. – Vol. 31. – P. 206-212.
48. Chaplin, D. D. Overview of the immune response [Текст] / D. D. Chaplin // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2010. – Vol. 125. – P. 3-23.
49. Chen, W. mTOR signaling is activated by FLT3 kinase and promotes survival of FLT3-mutated acute myeloid leukemia cells [Текст] / W. Chen, E. Drakos, I. Grammatikakis [et al.] // *Mol Cancer*. – 2010. – Vol. 9. – P. 292.
50. Chiou, S. H. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies [Текст] / S. H. Chiou, B. C. Sheu, W. C. Chang // *J. Reprod. Immunol.* – 2005. – Vol. 67. – P. 35–50.

51. Datta, S. R. Cellular survival: a play in three Akts [Текст] / S. R. Datta, A. Brunet, M. E. Greenberg // Genes Dev. – 1999. – Vol. 13. – P. 2905-2927.
52. Druker, B. J. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia [Текст] / B. J. Druker, M. Talpaz, D. J. Resta // Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 344. – P. 1031-1037.
53. Enver, T. Loops, lineage, and leukemia [Текст] / T. Enver, M. Greaves // Cell. – 1998. – Vol. 94. – P. 9-12.
54. Galoyan, A. A. Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus [Текст] / A. A. Galoyan. – Endocrine Heart. Moscow. Nauka Publ., 1997. – 240 p.
55. Galoyan, A. A. Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival [Текст] / A. A. Galoyan // Kluewr Academic/Plenum Publishers. – 2004. – T. 30, № 1. – P.188.
56. Goffarts, S. Alpha-actin and BAT 1 interaction with cytochrome C promoter upon skeletal muscle differentiation [Текст] / S. Goffarts, A. Franko, C. S. Clemen [et al.] // Current. Genetic. – 2006. – Vol. 49. – P. 125-135.
57. Hodges, G. M. A scanning electron microscope study of cell surface and cell contacts of “spantaneously” trntransformed cell *in vitro* [Текст] / G. M. Hodges // Eur. J. Cancer. – 1970. – Vol. 6. – P. 235-239.
58. Ichikawa, M. Molecular mechanism in the development of acute myeloid leukemia [Текст] / M. Ichikawa, M. Kurokawa // Nihon Rinsho. – 2009. – Vol. 67, № 10. – P. 1889-1893.
59. Insall, R. H. Actin dynamics at the leading edge: From simple machinery to complex networks [Текст] / R. H. Insall, L. M. Machesky // Dev. Cell. – 2009. – Vol. 17. – P. 310-322.
60. Kantarjian, H. M. Characteristic of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia [Текст] / H. M. Kantarjian // Cancer. – 1988. – Vol. 61. – P. 1441-1446.

61. Lorsbach, R. B. Megakaryoblastic disorders in children American Society for Clinical Pathology [Текст] / R. B. Lorsbach // Am J Clin Pathol. – 2004. – Vol. 122. – P. 33-46.
62. Ma, L. Quantitative and qualitative changes of antigen-presenting cells in myelodysplastic syndromes [Текст] / L. Ma, A. Kasran, M. Delforge [et al.] // Leukemia Research. – 2003. – Vol. 27, № 1. – P. 41.
63. Mavoungou, E. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol [Текст] / E. J. Mavoungou, M. C. Georges-Courbot, Poatu-Mavoungou [et al.] // Science articles of world periodical. – 1997. – Vol. 16, № 1. – P. 1-9.
64. McMahon, H. T. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling [Текст] / H. T. McMahon, J. L. Gallop // Nature. – 2005. – Vol. 438. – P. 590-596.
65. Mehlen, P. Metastasis: a question of life or death [Текст] / P. Mehlen, A. Puisieux // Nat. Rev. Cancer. – 2006. – Vol. 6. – P. 58-449.
66. Mestel, A. J. Effects of the glycocalyx on the electrophoretic mobility of red cells and on streaming potentials in blood vessels: predictions of a structurally-based model [Текст] / A. J. Mestel, A. J. Mokady, K. H. Parker [et al.] // Biorheology. – 1998. – Vol. 35, № 6. – P. 365-381.
67. Min, Y. H. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable [Текст] / Y. H. Min, J. I. Eom, J. W. Cheong [et al.] // Leukemia. – 2003. – Vol. 17. – P. 995–997.
68. Mrozek, K. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukemia [Текст] / K. Mrozek, K. Heinonen, C. D. Bloomfield // Best Practice and Research Clinical Haematology. – 2001. – Vol. 14. – P. 19-47.
69. Poch, M. T. Two distinct classes of CCAAT box elements that bind nuclear factor-Y/a-actinin-r: potential role in human CYPIAI regulation [Текст] / M. T. Poch, L. Al-Kassim, S. M. Smolinski [et al.] // Toxicol. Applied. Pharmacol. – 2004. – Vol. 199. – P. 239-250.
70. Quere, R. High levels of the adhesion molecule CD44 on leukemic cells generate acute myeloid leukemia relapse after withdrawal of the initial

transforming event [Текст] / R. Quere, S. Andradottir, A. M. Brun [et al.] // *Leukemia*. – 2011. – Vol. 25. – P. 515-526.

71. Sales, S. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia [Текст] / S. Sales, C. M. Vefaille // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21. – P. 8547-8559.

72. Sarkadi, B. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System [Текст] / B. Sarkadi, L. Homolya, G. Szakacs [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86. – ... P. 1179-1236.

73. Schafranek, L. Sustained inhibition of STAT5, but not JAK2, is essential for TKI-induced cell death in chronic myeloid leukemia [Текст] / L. Schafranek, E. Nievergall, J. A. Powell [et al.] // *Leukemia*. – 2015. – Vol. 29. – C. 76-85.

74. Schmitt-Graeff, A. Myelodysplastisches Syndrom: aspekte der hamatopathologischen Diagnostik [Текст] / A. Schmitt-Graeff, D. Mattern, H. Kohler [et al.] // *Pathologe*. – 2000. – Vol. 21. – P. 1-15.

75. Slivinsky, G. G. Cell electrophoresis – a method for cell separation and research into cell surface properties [Текст] / G. G. Slivinsky, W. C. Hymer, J. Bauer [et al.] // *Electrophoresis*. – 1997. – Vol. 18. – P. 109-119.

76. Steeg, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges [Текст] / P. S. Steeg // *Nat. Med.* – 2006. – Vol. 12. – P. 895-904.

77. Tehranchi, R. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome C release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors [Текст] / R. Tehranchi, B. Fadeel, A-M. Forsblom [et al.] // *Blood*. – 2003. – Vol. 101. – P. 1080-1086.

78. Testa, U. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia [Текст] / U. Testa, R. Riccioni // *Hematologic*. – 2007. – Vol. 92. – P. 81-94.

79. Wen, P. Y. Malignant gliomas in adults [Текст] / P. Y. Wen, S. Kesari // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – Vol. 359. – P. 492-507.

80. Yamazaki, D. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization [Текст] / D. Yamazaki, S. Kurisu, T. Takenawa // Cancer Sci. – 2005. – Vol. 96. – P. 86-379.

81. Zheng, Y. Decreased deformability of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia [Текст] / Y. Zheng, J. Wen, J. Nguyen [et al.] // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 10. – P. 1-5.