ГЕМАТОЛОГІЯ І ТРАНСФУЗІОЛОГІЯ

УДК 616.15

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2016

[1]В.Г.Бебешко, [1]К.М. Бруслова, [2]Л.М. Панченко, [1]Т.І. Пушкарьова, [1]Н.М. Цвєткова, [1]Л.О. Ляшенко, [3]Т.Т. Володіна, [1]О.Є. Кузнєцова, [1]Л.О. Гончар, [1]В.М. Пархоменко

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ ФУНКЦІОНАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ СТРОМАЛЬНИХ ФІБРОБЛАСТІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ, ПОКАЗНИКАМИ МІЄЛОГРАМИ ТА ПРОГНОЗОМ РЕЦИДИВУ ГОСТРИХ ЛЕЙКЕМІЙ У ДІТЕЙ

[1]ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМНУ», м. Київ,

[2]ДУ " Інститут травматології та ортопедії НАМНУ", м. Київ,

[3]Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАНУ, м. Київ

Вступ. Мікрооточення кісткового мозку складається зі стромальних фібробластів, головними функціями яких є створення умов для формування гемопоеза та периваскулярних ніш для клітин-попередників.

Мета. Прогнозування рецидиву гострих лейкемій у дітей за показником ефективності колонієутворення стромальних фібробластів кісткового мозку (ЕКУОф), вирощених ex vivo, та результатами мієлограм.

Матеріали і методи. Обстежено 35 хворих на гострі лейкемії (22 з ГЛЛ, 13 з ГМЛ). Вивчали ЕКУОф, показники мієлограм, враховували відсутність/ наявність рецидиву захворювання. Застосовували методи статистики (коефіцієнт кореляції Ст'юдента, Спірмена, U-тест Манна-Уїтні).

Результати. Показники ЕКУОф у хворих не залежали від варіанту ГЛ і становили 8,71+1,02 серед 105 ядровміщуючих клітин. Нами встановлений зворотний кореляційний зв'язок між показником ЕКУОф у дітей, хворих на ГЛ, та числом еритробластів (Ro-Spearm=- 0,52) і моноцитів (Ro-Spearm=- 0,45) в мієлограмі, що свідчить про вплив фібробластів на функціонування гемопоезу в умовах розвитку злоякісного процесу. Встановлений зворотний кореляційний зв'язок між кількістю моноцитів в мієлограмах та вірогідністю розвитку рецидиву у хворих на ГЛ (Ro-Spearm= - 0,44).

Висновки. Доведено регулюючу роль стромального мікрооточення на гемопоез у дітей з ГЛ. Виявлено зв'язок між розвитком рецидиву у хворих на ГЛ та кількістю моноцитів в кістковому мозку, що відкриває подальші можливості для визначення механізмів формування хіміорезистентності та підвищення ефективності лікування хворих на ГЛ.

Ключові слова: гострі лейкемії, діти, фібробласти, гемопоез, прогноз.

Вступ. До складу мікрооточення відносяться стромальні фібробласти, головними функціями яких є формування кровотворного кістковомозкового мікрооточення та створення периваскулярних ніш для клітин-попередників. При гемобластозах кістковий мозок являє собою анатомічну ділянку, в якій пухлинне мікрооточення має морфофункціональні особливості [1]

Мета - прогнозування рецидиву гострих лейкемій (ГЛ) у дітей за показником ефективності колонієутворення стромальних фібробластів кісткового мозку (ЕКУОф), вирощених ex vivo, та результатами мієлограм.

Матеріали та методи. Під наглядом знаходилось 35 дітей: з гострою лімфобластною лейкемією (ГЛЛ) 22 дитини, гострою мієлобластною лейкемією (ГМЛ) 13 хворих. Вік дітей коливався від 6 до 18 років. Розподіл хворих за статтю був майже рівномірний. Хлопчиків було 17 (з ГЛЛ – 10, ГМЛ – 7), дівчат – 18 (з ГЛЛ – 12, ГМЛ – 6). Спостереження за хворими ведеться з 2000 року. Показники мієлограм у хворих на ГЛ були порівнянні з результатами у дітей без онкогематологічної патології. Хворі обстежувались у фазі ремісії після закінчення повного курсу хіміотерапії, яку вони отримували згідно зі стандартизованими протоколами з приводу первинно встановленого діагнозу гострої лейкемії. У 15 хворих (з ГЛЛ –12, ГМЛ – 3) клініко-гематологічна ремісія утримувалась протягом 179,8+8,7 міс. У 20 хворих відмічалась резистентність до хіміотерапії та реєструвались рецидиви в різні строки захворювання (ГЛЛ–10, ГМЛ–10).

Вивчалиефективністьклонуванняколонієутворюючиходиницьстромальних фібробластів кісткового мозку ex vivo за методикою О.Я.Фріденштейна (1973) в модифікації В.С.Астахової (1982). Кістковий мозок отримували з грудини при проведені стернальної пункції, наносили на предметні скельця, фарбували за Романовським-Гімзою та вивчали у світловому мікроскопі (збільшення n x 900). Підраховували елементи мієлограми (у відсотках). За критерії ефективності хіміотерапії прийнято відсутність/наявність рецидиву захворювання. Для статистичної обробки матеріалів застосовували коефіцієнт кореляції Ст'юдента, Спірмена, U-тест Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення. Середні значення показників ефективності колонієутворюючих одиниць стромальних фібробластів (ЕКУОф) у дітей з ГЛ без урахування варіантів не розрізнялись і становили 8,71+1,02 серед 105 ядровміщуючих клітин (ГЛЛ –7,36 +1,41, ГМЛ – 10,06+1,38), що дозволило нам об'єднати пацієнтів за цим параметром в одну групу спостереження ($p>0,05$).

В мієлограмі у хворих на ГЛЛ було більше сегментоядерних гранулоцитів порівняно з ГМЛ ($p<0,05$). Крім того, у хворих виявлено збільшення числа оксифільних нормоцитів порівняно зі здоровими дітьми, що може бути обумовлено затримкою дозрівання ядра на етапі диференціювання в ретикулоцити або порушенням формування цитоскелету клітин [2].У хворих на ГЛ відмічається зниження відсотку перехідних форм гранулопоезу (мієлоцитів, метамієлоцитів, паличкоядерних) ($p<0,05$), хоча дозрілі форми гранулоцитів (сегментоядерні) були в межах нормативного, що свідчить про порушення процесів відновлення кістковомозкового кровотворення.

Число мієлокаріоцитів у хворих на ГЛЛ та ГМЛ не корелювало з відсотком клітин-попередників в мієлограмах. Визначені деякі зв'язки між елементами мієлограм. Так, встановлений прямий кореляційний зв'язок між

кількістю моноцитів та промієлоцитів і мієлоцитів (Ro-Spearm.= +0,38), що логічно витікає з фізіологічних процесів функціонування кістковомозкового кровотворення та впливу ростових факторів, зокрема ГМ-КСФ. Визначено прямий кореляційний зв'язок між загальною кількістю еритроїдних елементів в кістковому мозку та еритробластів, що має фізіологічну підставу щодо відновлення даного паростку після хіміотерапії (Ro-Spearm=+0, 64). Визначено також позитивний зв'язок між числом еритробластів та числом моноцитів (Ro-Spearm =+ 0,59). Як відомо, еритроїдні острівці є початковим етапом розвитку еритрону. Вони утворюють компактні скупчення, в центрі яких розташовуються моноцити, що містять запас заліза, необхідний для подальшого процесу проліферації та диференціювання елементів еритроїдної ланки [3, 4].

Нами оцінена функціональна активність ЕКУОф в порівняльному аспекті з показниками мієлограм у дітей залежно від варіантів захворювання. Не було встановлено різниці між показниками мієлограм у дітей залежно від варіантів захворювання. Тому в подальшому ми проаналізували зв’язок між індивідуальними величинами показників мієлограм та ЕКУОф у хворих на гострі лейкемії не залежно від варіантів хвороби. Ми встановили зворотний кореляційний зв'язок між показником ЕКУОф та числом еритробластів (Ro-Spearm=-0,52) і моноцитів в мієлограмі (Ro-Spearm=-0,45). Це пояснюється тим, що фібробласти кісткового мозку у хворих на ГЛ, які є клітинами сполучної тканини, синтезують позаклітинний матрикс, можуть прискорювати міграцію пухлинних клітин у різні органи людини, пригнічувати процеси проліферації клітин-попередників, а також зменшувати чутливість лейкемічних клітин до хіміотерапевтичних засобів [1]. Підтвердженням цього факту є встановлений нами зворотний кореляційний зв’язок між кількістю моноцитів в мієлограми та вірогідністю розвитку рецидиву ГЛ у хворих (Ro-Spearm = - 0,44). Таким чином, нами виявлена зворотна кореляційна залежність між показником ЕКУОф, кількістю еритробластів та моноцитів в кістковому мозку, а також моноцитами та вірогідністю розвитку рецидиву гострих лейкемій (ГЛЛ, ГМЛ) у дітей.

Висновки. Встановлена регулююча роль елементів стромального мікрооточення у функціонуванні гемопоезу в умовах розвитку злоякісного процесу у дітей. Це відкриває можливості щодо визначення механізмів формування хіміорезистентності та підвищення ефективності лікування хворих на ГЛ.

Література

1. Raffaghello L. Cancer associated fibroblasts in hema-tological malignancies / Raffaghello L., Pistoia V., Ribatti D. // Oncotarget. -2015. - № 6(5). – P. 2589–2603.

2. Rivella S. Enucleate or replicate? Ask the cytoskeleton. // Blood. – 2014. - № 30, 123 (5). – P.601–602.

3. Владимирская Е.Б. Клиническая онкогематология. // Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2015. - Т. 8, № 2. – P. 109-119.

4. Back D. Of macrophages and red blood cells; a com-plex love story. / Back D., Kostova E., Kraaij M. // Front. Physiol. – 2014. -№ 5. – P. 9.

В.Г.Бебешко, Е.М.Бруслова, Л.М.Панченко, Т.И.Пушкарева, Н.М.Цветкова, Л.А.Ляшенко, Т.Т.Володина, Е.Е.Кузнецова, Л.А.Гончар, В.Н.Пархоменко

Взаимосвязь между функциональной активностью стромальных фибробластов костного мозга, показателями миелограммы и прогнозом рецидива острых лейкемий у детей

ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины НАМНУ», г. Киев,

ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМНУ», г. Киев,

Институт биохимии им. А.В.Палладина НАНУ, г. Киев

Введение. Микроокружение костного мозга состоит из стромальных фибробластов, основными функциями которых является создание условий для формирования гемопоэза и периваскулярных ниш для клеток-предшественников.
Цель. Прогнозирование рецидива острых лейкемий (ОЛ) у детей по показателю эффективности колониеобразования стромальных фибробластов костного мозга (ЭКОЕф), вырощенных ex vivo, и результатам миелограмм.
Материалы и методы. Обследовано 35 больных острыми лейкемии (22 с ОЛЛ, 13 с ОМЛ). Изучали ЭКОЕф, показатели миелограммы, учитывали отсутствие / наличие рецидива заболевания. Применяли методы статистики (коэффициент корреляции Стьюдента, Спирмена, U-тест Манна-Уитни).
Результаты. Показатели ЭКОЕф у больных не зависели от варианта ОЛ и составили 8,71+1,02 среди 105 ядросодержащих элементов. Нами установлена обратная корреляционная связь между показателем ЭКОЕф у больных и числом эритробластов (Ro-Spearm =- 0,52) и моноцитов (Ro-Spearm =- 0,45) в миелограмме, что свидетельствует о влиянии фибробластов на функционирование гемопоэза в условиях развития злокачественного процесса. Установлена обратная корреляционная связь между числом моноцитов в миелограмме и вероятностью рецидива ОЛ у больных (Ro-Spearm =- 0,44).
Выводы. Доказано регулирующее влияние стромального микроокружения на гемопоэз у детей с ОЛ. Выявлена связь между развитием рецидива у больных ОЛ и количеством моноцитов в костном мозге, что открывает дальнейшие возможности для определения механизмов формирования химиорезистентности и повышения эффективности терапии у больных ОЛ.
Ключевые слова: острые лейкемии, дети, фибробласты, гемопоэз, прогноз.

V.G.Bebeshko, K.M.Bruslova, L.M.Panchenko, T.I.Pushkareva, N.M. Tsvietkova, L.O.Lyashenko, T.T.Volodina, E.E.Kuznetsova, L.O.Gonchar, V.N. Parhomenko

Relationship between the functional activity of bone marrow stromal fibroblasts, myelogram results and prognosis of relapse in children with acute leukemia

SI «National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine»,

SI «Institute of Traumatology and Orthopedics of the NAMS of Ukraine»,

O.V.Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine

Introduction. The microenvironment of bone marrow consists of stromal fibro-blasts, which main functions are the formation of hemopoiesis and perivascular niches for progenitor cells.
Aim. Making the prognosis of relapse in children with acute leukemia (AL) by the ex vivo colony forming unit-fibroblasts efficiency (E -CFUf) and myelogram results.
Materials and methods. The survey uncluded 35 patients with acute leukemia (22-ALL, 13 - AML). E -CFUf, myelogram results, presence/absence of AL relapse were studied. We used the methods of standard statistics (Student correlation coefficient, Spearman correlation coefficient, U-Mann-Whitney test).
Results. E–CFUf indices in patients were not dependent on AL variant and deter-mined as 8,71+1,02 among 105 nucleated cells. We found an inverse correlation between E–CFUf index in children with AL and the number of erythroblasts (Ro-Spearm = - 0,52) and monocytes (Ro-Spearm = - 0,45) in myelograms, which indicates that fibroblasts influence on the functioning of hemopoiesis in conditions of malignancy process. The inverse correlation (Ro-Spearm =- 0,44) between the number of monocytes in myelograms and the possibility of relapse in patients with AL was found.
Conclusions. The regulatory role of stromal microenvironment in functioning of hematopoiesis in children with AL was proved. The connection between the development of relapse in patients with AL and the number of monocytes in the bone marrow was revealed, which opens up further possibilities for the determination of mechanisms of chemoresistance and improvement of the effectiveness of therapy in AL patients.
Key words: acute leukemia, children, fibroblasts, hemopoiesis, prognosis.

Відомості про авторів:
Бебешко Володимир Григорович - чл.-кор. НАМНУ, д.мед.н., проф., ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМНУ». Адреса: 04050, Київ, Мельникова 53, тел.: (044) 452-59-81.
Бруслова Катерина Михайлівна - д.мед.н. зав. відділення радіаційної гематології дитячого віку ІКР, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМНУ». Адреса: 04050, Київ, Мельникова 53, тел.: (044) 450-74-01.
Панченко Леся Михайлівна - к.мед.н. ст.н.с. ДУ " Інститут травматології та ортопедії НАМНУ". Адреса: 04050, Київ, Мельникова 53, тел.: (044) 450-74-01.
Пушкарьова Тетяна Іванівна - м.н.с., відділення радіаційної гематології дитячого віку ІКР, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМНУ». Адреса: 04050, Київ, Мельникова 53, тел.: (044) 450-74-01.
Цвєткова Наталія Михайлівна - к.мед.н., ст.н.с., відділення радіаційної гематології дитя-чого віку ІКР, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМНУ». Адреса: 04050, Київ, Мельникова 53, тел.: (044) 450-74-01.
Ляшенко Людмила Олександрівна - к.біол.н., вчений секретар ІКР, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМНУ». Адреса: 04050, Київ, Мельникова 53, тел.: (044) 451-17-83.
Володіна Тетяна Терентіївна - к.біол.н., ст.н.с., відділ регуляції обміну речовин, Інститут біохімії ім. А.В. Палладіна, НАНУ. Адреса: 04119, Київ, Леонтовича 9, тел.: (044) 234-43-45.
Кузнєцова Олена Євгеніївна - к.мед.н., відділення радіаційної гематології дитячого віку ІКР, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМНУ». Адреса: 04050, Київ, Мельникова 53, тел.: (044) 406-64-26.
Гончар Лариса Олексіївна - лікар відділення радіаційної гематології дитячого віку клініки, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМНУ». Адреса: 04050, Київ, Мельникова 53, тел.: (044) 406-64-26.
Пархоменко Віра Миколаївна - лікар відділення радіаційної гематології дитячого віку клініки, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМНУ». Адреса: 04050, Київ, Мельникова 53, тел.: (044) 406-64-26.