

КИЇВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ПЕРЕЛИВАННЯ КРОВІ
МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

На правах рукопису

АНДРЕЄВА Світлана Василівна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ССОБЛИВОСТІ
ЯДЕРЦЕВОГО АПАРАТУ БЛАСТНИХ КЛІТИН
ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ ЛЕЙКОЗ**

14.01.36 - Гематологія та переливання крові

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертація на здобуття наукового ступеню
кандидата біологічних наук



Київ - 1996



013.38
616.15

Дисертація є рукопис.

Робота виконана у Київському НДІ гематології та переливання крові МОЗ України. 00344012 (E)

Наукові керівники: доктор медичних наук, професор
РОМАНОВА Алла Федорівна

доктор медичних наук
ПОГОРЕЛОВ Валерій Михайлович

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
ПІНЧУК Людмила Борисівна

доктор біологічних наук, професор
МАЛЮТА Станіслав Станіславович

Провідна організація: Київський державний інститут
здооконання лікарів МОЗ України

Захист відбудеться "26" серпня 1996 р.
на засіданні спеціалізованої Вченої Ради Д 01.40.91
у Київському НДІ гематології та переливання крові
МОЗ України (254060, Київ, вул. М. Берлінського, 12)

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Київського НДІ
гематології та переливання крові МОЗ України.

Автореферат розісланий "24" травня 1996 р.

Вчений секретар
спеціалізованої Вченої Ради В. Г. Комісаренко

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

• Актуальність теми. Незважаючи на успіхи, що були досягнуті при вивченні морфо-функціонального стану злоякісних клітин при гемобластозах і, зокрема, при гострих лейкозах, ряд питань, що стосуються характеристики їх генетичного апарату залишаються ще недостатньо вивченими. Незалежно від конкретних причин та механізму злоякісної трансформації, деякі її особливості зумовлені порушенням регуляції мітотичного циклу. На кінцевих етапах пухлинної прогресії злоякісні клітини повністю виходять з-під контролю зовнішніх регуляторних факторів, зберігаючи при цьому механізми внутрішньоклітинної авторегуляції. Це призводить до змін у структурі та функції ядерцевого апарату, який є важливою ланкою у біосинтезі білка (Арден К., Патак С., 1990).

В останній час ці питання знаходяться у центрі уваги вчених про що свідчить зростання кількості праць, присвячених вивченню районів, що організують ядерце (ЯДР) метафазних хромосомах та ядерцевого апарату в інтерфазних ядрах (Зацепина О.В., Сметяна К., 1985; Мамзев Н.Н. и др., 1988; Ploton D., et al, 1988). Перспективність такого роду досліджень обумовлюється можливістю дати характеристику функції рибосомних генів на цитологічному рівні. Серед них є ніка робіт в яких доведена діагностична (Zankl H., et al, 1990) і прогностична (Delahunt B., et al, 1991) цінність досліджень в цьому напрямі при злоякісних захворюваннях у людини. Однак, кількість досліджень по вивченню ядерцевого апарату при гострому лейкозі ще незначна, а дані про стан ядерцевого апарату при різних варіантах гострого лейкозу носять суперечливий характер (Иконникова О.А. и др., 1989; Popp W., et al, 1986). Складним залишається питання про вплив цитостатиків, які також можуть змінювати функціональну активність ядерце-

вого апарату (Воскобойник Н.И., 1987; Sokol R.J., 1989; Kagar'ov I.K., et al, 1988).

Мета і задачі досліджень. Метою цього дослідження є вивчення структурно-функціональних особливостей ядерцевого апарату в бластних клітинах хворих на гострий лейкоз.

Для досягнення поставленої мети андобилося вирішити наступні задачі:

- провести порівняльне дослідження функціональної активності ядерцевого апарату бластних клітин хворих на різні варіанти гострого лейкозу;
- визначити взаємозв'язок між різними показниками ядерцевого апарату і проліферативною активністю інтерфазних ядер бластних клітин кісткового мозку та периферичної крові хворих на гострий лейкоз;
- розробити критерії, які дозволять по функціональному стану ядерцевого апарату бластних клітин оцінювати чутливість лейкозного клону до дії цитостатичних препаратів, що застосовуються при лікуванні гострого мієлобластного лейкозу.

Наукова новизна досліджень. Довказано прямий взаємозв'язок між проліферативною активністю і кількістю Ag-позитивних ЯОР як у бласттрансформованих лімфоцитах донорів так і у бластних клітинах хворих на гострий лейкоз.

Встановлено, що проліферативна активність бластних клітин хворих на гострий лейкоз і активність ядерцевого апарату нижче, ніж у бласттрансформованих лімфоцитах периферичної крові донорів.

Виявлені відмінності вмісту Ag-ЯОР і ядерць великих розмірів у бластних клітинах при гострому лімфобластному (ГЛЛ) і гострому нелімфобластному лейкозі (ГНелЛ). Найнижчий рівень функціональної активності бластних клітин встановлено при

тому лейкозі (ГМОЛ).

Проведено порівняльний аналіз кількості, розмірів та структури ядерець і кількості Ag-ЯДР з урахуванням етчності лікування гострого мієлобластного лейкозу (ГМЛ). Встановлено, що по зміні кількісних співвідношень великих і компактних ядерець у ядрах бластних клітин вже у перші дні терапії можна прогнозувати чутливість бластних клітин до дії цитостатичних препаратів.

Практична цінність роботи. Розроблений та запропонований комплекс об'єктивних параметрів для ядерець бластних клітин може бути використаний як додатковий діагностичний тест для встановлення різних варіантів ГМЛ, а також для оцінки чутливості лейкозного клону до сучасних програм поліхіміотерапії у ранні строки її застосування при ГМЛ.

Основні положення, що виносяться на захист:

1. Кількість Ag-ЯДР у ядрах бластних клітин хворих на гострий лейкоз являється критерієм їх проліферативної активності.
 2. У хворих на ГМЛ та ГМОЛ кількість Ag-ЯДР, великих і компактних ядерець у ядрах бластних клітин вже до початку лікування може служити прогностичним критерієм перебігу захворювання.
 3. Зміна кількості Ag-ЯДР, великих і компактних ядерець у ядрах бластних клітин хворих на ГМЛ вже у перші дні терапії свідчать про чутливість лейкозного клону до дії цитостатиків.
- Упровадження результатів досліджень у практику. Результати дисертації увійшли до методичних рекомендацій "Критерії розпознавання злоякісних кліток в крові і кровотворних органах", Київ, 1992.

Отримано 1 посвідчення на раціоналізаторську пропозицію

"Модифікація методу пофарбування активних ядерцевих організмів та ядерещ" з N 533 КНДІГПК від 23 лютого 1989 р.

Метод запроваджено у гематологічному відділенні для дорослих ЛФО Шевченківського району м. Києва.

А. робота роботи. Матеріали дисертаційної роботи викладені на Міжнародному конгресі молодих вчених по клінічній медицині (Київ, 1992); онкоцитогенетичному семінарі (Гіссен, 1994). По темі дисертації опубліковано 3 наукові роботи.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація викладена на 133 сторінках машинописного тексту, складається із вступу, чотирьох глав огляду літератури, трьох глав власних досліджень, висновків, додатків. Список літератури включає 220 джерел, з них 77 - вітчизняних і 143 - іноземних. Робота ілюстрована 9 таблицями та 15 малюнками.

Усі положення, що виносяться до захисту, розроблені автором особисто.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на мазках периферичної крові та кісткового мозку 62 хворих (у віці від 17 до 69 років) на різні варіанти гострого лейкозу (ГЛ), з них у 34 хворих було встановлено діагноз ГЛ, у 6 - гострий мієломонобластний лейкоз (ГММЛ), у 11 - ГМЛ і у 11 - ГЛЛ. Хворі знаходились на лікуванні у гематологічному відділенні для дорослих ЛФО Шевченківського району м. Києва з 1988 по 1991 рр.

Контрольну групу склали 10 донорів у віці від 25 до 45 років. Для активації хроматину периферичну кров донорів культивували в ФГА. Мазки готували після ваяття крові (0 годин), через 24, 48 та 72 години культивування з мітогеном.

Вивчення активності ядерцевого апарату у хворих на ГЛ

проводили у кістковому мозку та периферичній крові до початку поліхіміотерапії. У хворих на ГМІ активність адерцевого апарату визначали у динаміці лікування. Мазки фіксували із клітинної культури бласттрансформованих лімфоцитів донорів, кісткового мозку і периферичної крові хворих на гострий лейкоз, фіксували у суміші етанол-оцтової кислоти і фарбували за Olert J. (1979) у розробленій нами модифікації (раціоналізаторська пропозиція N533 КНДІГПК). У кожному випадку оцінювали 100 ядер. При цьому обчислювали нуклеолярний коефіцієнт (середня кількість ядерць на одне ядро - НК) і середню кількість пофарбованих сріблом ЯОР (Ag-ЯОР). Морфологічно виділяли три типи ядерць: компактні (M1), кільцевидні (M2) і мікроядерця (M3). Розміри ядерць оцінювали по трьохбальній системі. Ядерця, які займають від 0,1 до 1,0 % всієї площі ядра позначали S1, які займали від 1,1 до 6,0 % - S2, великі ядерця від 6,1 до 21,0 % - S3.

Проліферативну активність бластних клітин хворих вивчали у кістковому мозку та периферичній крові до початку хіміотерапії, а у мазках периферичної крові донорів - у всі чотири строки спостереження. Мазки фіксували у розчині формалін - спирт - оцтова кислота (ФСО) протягом 90 хвилин, фарбували за Фольгеним.

Статистична обробка отриманих результатів здійснювалась на персональному комп'ютері по програмі "STATGRAF".

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Активация ядерцевого апарату бласттрансформованих лімфоцитів периферичної крові людини

Найбільш розповсюдженою моделлю для дослідження активации

хроматину ядер клітин в лімфоцити людини, які стимулюють за допомогою ФГА.

Статистична обробка отриманих результатів за допомогою регресійного аналізу показала, що всі вибрані нами параметри (НК, розміри та морфологія ядерця, кількість Ag-ЯОР) у динаміці бласттрансформації описуються рівняннями простої регресії. Зміна НК описується лінійним рівнянням $y = -1,14 + 0,28X$, $r = 0,92$ ($P < 0,001$); характер зміни ядерця $S_1 - y = 14,98 - 2,03X$, $r = 0,44$ ($P < 0,005$). Зміна кількості ядерця $S_2, S_3 - y = 82,20 - 19,93X$, $r = 0,92$ ($P < 0,001$) та $y = 4,00 + 31,96X$, $r = 0,95$ ($P < 0,001$), відповідно.

Як і всі попередні показники зміни ядерця M_1, M_2 та M_3 описуються лінійними рівняннями: $y = 0,60 + 21,03X$, $r = 0,94$ ($P < 0,001$), $y = 79,00 - 18,03X$, $r = 0,54$ ($P < 0,001$) і $y = 18,10 - 2,80X$, $r = 0,59$, ($P < 0,001$). Тільки активація ЯОР у динаміці ФГА-стимуляції описується ступінним рівнянням $y = 1,99^{1,14}$, $r = 0,95$ ($P < 0,001$).

Порівнюючи показники, що характеризують ядерцевий апарат і проліферативну активність ФГА-стимульованих лімфоцитів, ми отримали наступні результати: після 48 годин стимуляції коефіцієнт кореляції для НК склав $r = 0,89$ ($P < 0,001$), для Ag-ЯОР - $r = 0,97$ ($P < 0,001$), для числа ядерця $S_1 - r = 0,81$ ($P < 0,005$). Після 72 годин стимуляції коефіцієнт кореляції був для НК $r = 0,74$ ($P < 0,05$), для Ag-ЯОР $r = 0,89$ ($P < 0,005$). Тобто, з посиленням проліферативної активності збільшується величина НК і кількість Ag-ЯОР.

Таким чином, у процесі бласттрансформації лімфоцитів периферичної крові донорів ми спостерігали поступову активацію хроматину клітин, що виражалася у збільшенні НК, середньої кількості Ag-ЯОР, процентного вмісту компактних і великих

ядерець. Результати кореляційного і регресійного аналізу свідчать про те, що закономірні зміни усіх показників ядерцевого апарату дозволяють використовувати саме ці параметри для характеристики активації хроматину.

2. Функціональна активність ядерцевого апарату бластних клітин кісткового мозку та периферичної крові хворих на різні варіанти гострого лейкозу

Для в'ясування можливості використання показників ядерцевого апарату у діагностиці варіантів гострого лейкозу, проведено вивчення кількісних і якісних характеристик ядерць і Ag-ЯОР у бластних клітинах кісткового мозку та периферичної крові 51 хворого на ГНеЛЛ, 11 хворих на ГЛЛ.

Кількість ядерць в бластних клітинах кісткового мозку та периферичної крові хворих, незалежно від варіанту захворювання, коливалася від 1 до 9. Однак, ядерця 53 частіше зустрічалися у периферичній крові при ГЛЛ ($P < 0,02$).

При вивченні структури ядерць встановлено, що ядерця М1 також частіше зустрічалися при ГЛЛ ($P < 0,05$ для бластних клітин периферичної крові). Середні значення НК при ОЛЛ і при всіх варіантах ГНеЛЛ практично не відрізнялися один від одного як для бластних клітин кісткового мозку, так і для периферичної крові (табл. 1).

Кількість Ag-ЯОР у клітинах кісткового мозку та периферичної крові при ГЛЛ перевищувала такі показники при ГНеЛЛ.

Отримані результати свідчать про те, що для бластних клітин хворих на ГЛЛ характерна більш виражена білок-синтезуюча активність. При порівнянні параметрів бластних клітин кісткового мозку та периферичної крові встановлено, що у кліти-

Таблица 1

Показатели активности ферментов печени багратских кайтан кистозного нукле
та определяются: кроби изотки на ГГенА и ГАА до зочатку зинотерапии. (N=1)

Вариант заборна вакна	Об'єкт доцалення кн	Амколати (х/с /а)	Бактери кайткен (%)	КК	Віанокрен візит. %					Ag-90P	S+2 (%)	
					S1	S2	S3	S1	S2			S3
ГГенА	Кистозні ночки (n=30)		76,52±4,89	3,18±0,38	27,23±4,29	51,69±8,51	20,88±3,27	31,90±5,13	37,70±5,99	30,29±3,47	7,09±0,53	3,54±0,45
				(P<0,01)	(P<0,05)		(P<0,001)	(P<0,001)		(P<0,01)	(P<0,01)	(P<0,001)
					(P<0,001)		(P<0,001)			(P<0,001)	(P<0,001)	(P<0,001)
ГАА	переводити на кроб (n=51)	63,45±12,58	74,12±6,22	2,81±0,55	40,53±4,66	40,89±3,87	18,67±2,68	24,66±3,33	41,26±7,14	34,03±3,93	6,23±0,83	2,76±0,29
					(P<0,001)		(P<0,02)	(P<0,05)		(P<0,001)	(P<0,001)	(P<0,05)
					(P<0,001)		(P<0,001)	(P<0,001)		(P<0,001)	(P<0,001)	(P<0,001)
ГАА	Кистозні ночки (n=10)		91,68±11,83	3,22±0,17	35,40±4,00	32,35±3,76	32,20±2,21	41,85±3,21	27,23±3,42	31,70±3,29	9,14±0,80	5,71±0,68
					(P<0,001)	(P<0,001)		(P<0,001)	(P<0,001)	(P<0,001)	(P<0,002)	(P<0,001)
					(P<0,001)	(P<0,001)				(P<0,001)		(P<0,001)
ГАА	переводити на кроб (n=11)	147,62±37,21	82,14±8,31	2,93±0,18	22,19±5,52	46,06±3,88	22,81±2,20	46,40±2,32	31,68±5,06	21,89±2,84	8,25±1,08	4,22±0,66
					(P<0,001)	(P<0,01)		(P<0,001)	(P<0,001)	(P<0,05)	(P<0,001)	(P<0,001)
					(P<0,001)	(P<0,001)		(P<0,001)		(P<0,001)	(P<0,001)	(P<0,002)

ПРИМІТКИ: P - рівень віротілності між показниками при ГГенА і ГАА

P1 - рівень віротілності між показниками при ГГенА (ГАА) і баграттрансформованих лімфоцитів (48 годин стінняції)

P2 - рівень віротілності між показниками при ГГенА (ГАА) і баграттрансформованих лімфоцитів (72 годин стінняції)

нях кісткового мозку активність ядерцевого апарату була вище, ніж у клітинах периферичної крові. Можливо, це пов'язано з тим, що у периферичну кров виходять більш диференційовані елементи.

Порівняння параметрів ядерцевого апарату у бластних клітинах хворих на гострий лейкоз та бласттрансформованих лімфоцитах дозволило встановити, що для бластних клітин характерні більш високі значення НК, ніж для бласттрансформованих лімфоцитів. Ці відмінності найбільш виражені при порівнянні середніх значень НК бластних клітин кісткового мозку хворих на ГНеЛЛ ($P1 < 0,05$) і ГЛЛ ($P1 < 0,001$ і $P2 < 0,001$), бластних клітин периферичної крові хворих на ГЛЛ ($P1 < 0,001$ і $P2 < 0,001$) та НК бласттрансформованих лімфоцитів через 48 ($P1$), 72 години ($P2$) культивування з ФГА.

При цьому ядрця M3 і S1 частіше зустрічалися у бластних клітинах кісткового мозку ($P1 < 0,001$, $P2 < 0,001$), а ядрця M1 і S3 - у бласттрансформованих лімфоцитах донорів із 48 та 72 годинних культур ($P1 < 0,001$, $P2 < 0,001$). Кількість зв'язаних з сріблом ЯОР у бластних клітинах кісткового мозку хворих на ГЛЛ ($9,14 \pm 0,80$) практично співпадала з такою у бласттрансформованих лімфоцитів на 72 годині культивування з ФГА ($9,70 \pm 0,43$), а у бластних клітинах периферичної крові ($8,25 \pm 1,08$) з кількістю Ag-ЯОР у лімфоцитах 48 годинної культури ($8,38 \pm 1,38$). Для ГНеЛЛ кількість Ag-ЯОР у бластних клітинах кісткового мозку ($7,09 \pm 0,53$) та периферичної крові ($6,23 \pm 0,83$) були вірогідно нижчими при порівнянні з бласттрансформованими лімфоцитами з 48 та 72 годинних культур ($P1 < 0,01$, $P2 < 0,001$).

Кореляційний аналіз даних, що були отримані для бластних клітин кісткового мозку хворих на гострий лейкоз, неаалежно

від варіанту захворвання, виявив позитивну кореляцію між кількістю ядерців S3 і Ag-ЯОР ($r=0,68$, $P<0,001$) і від'ємну кореляцію між значеннями Ag-ЯОР і кількістю ядерців S1 ($r=0,52$, $P<0,02$). Величина НК позитивно корелювала з кількістю ядерців S1 ($r=0,43$, $P<0,03$) і від'ємно - з кількістю ядерців S3 ($r=0,69$, $P<0,006$).

Для бластних клітин периферичної крові показана позитивна кореляція між кількістю ядерців S3 і середніми значеннями Ag-позитивних ЯОР ($r=0,73$, $P<0,001$), від'ємна кореляція між значеннями останніх та кількістю ядерців S1 ($r=0,69$, $P<0,005$), а також між величиною НК і кількістю ядерців S3 ($r=0,50$, $P<0,02$).

Крім того, було відмічено позитивний кореляційний зв'язок між числом Ag-ЯОР і ядрами M1 ($r=0,66$, $P<0,001$) і від'ємний кореляційний зв'язок між Ag-ЯОР і кількістю ядерців M3 ($r=0,51$, $P<0,02$).

Таким чином, високий вміст Ag-ЯОР у бластних клітинах кісткового мозку та периферичної крові тісно пов'язаний з кількістю ядерців великих розмірів. Чим більше ядерців містить клітина, тим менші їх розміри і, навпаки. Ці факти можуть свідчити про те, що популяція бластних клітин знаходиться у г'яньому G₁-періоді.

Ця гіпотеза знаходить підтвердження і за результатами, що були отримані при вивченні проліферативної активності клітин. При різних варіантах ГНєЛЛ і ГЛЛ кількість проліферуючих клітин була значно меншою, ніж серед бласттрансформованих лімфоцитів ($F_{1,2}<0,001$). При цьому показники проліферативної активності у бластних клітинах кісткового мозку та периферичної крові прямо корелювали з кількістю Ag-ЯОР ($r=0,94$, $P<0,001$ та $r=0,61$, $P<0,002$, відповідно) і від'ємно

- а кількістю ядерців малих розмірів ($r=0,49$, $P<0,03$ та $r=0,58$, $P<0,01$).

Серед хворих ГНеЛЛ суттєві відмінності показників, що ми аналізували, були виявлені для ГМЛ та ГМол, а саме: при ГМол кількість великих (більш ніж у 5 разів), компактних ядерців (більш ніж у 4 рази), число Ag-ЯДР (більш ніж на 50 %) у бластних клітинах периферичної крові була нижче, ніж при ГМЛ. Ці дані знаходять своє відображення також у більш низькій (на 50 %) проліферативній активності клітин (табл. 2).

При ГМол показники ядерцевого апарату бластних клітин периферичної крові займали проміжне положення між ГМЛ та ГМол.

Аналіз результатів, що отримано при ГНеЛЛ дозволив припустити, що при ГМол і, особливо, при ГМол ніякі значення кількості великих і компактних ядерців, числа Ag-ЯДР та проліферативної активності свідчать про те, що основна частина лейкозного клону складається з більш диференційованих клітин при порівнянні з ГМЛ і ГЛЛ.

Кореляційний аналіз виявив позитивну залежність між кількістю Ag-ЯДР у бластних клітинах кісткового мозку ($r=0,91$, $P<0,001$) і периферичної крові ($r=0,61$, $P<0,002$) та їх проліферативною активністю, а також зворотною залежністю останньої від кількості ядерців S1, як для бластних клітин кісткового мозку ($r=0,49$, $P<0,03$), так і периферичної крові ($r=0,58$, $P<0,01$).

При кожному варіанті ГЛ хворі умовно були поділені на дві групи. До першої групи увійшли хворі, у яких тривалість життя не перевищила одного місяця. До другої групи увійшли хворі з тривалістю життя більше ніж один місяць. З урахуванням поділу на ці групи найбільш значимі відмінності у-

Таблица 2
Показатели активности клеточного аппарата бластных клеток костного мозга
та периферичної крові хворих на ГМО, ГМОд і ГМОд до початку лікування, (M±m)

Варіант зліпков- зани	Об'єкту досліджен- ня	Високонуть (x10 /a)	Бластні клетки (%)	КК	Відносні вист. %						Ag-20P	S+G2 (%)
					S1	S2	S3	W1	W2	W3		
ГМО	кiстковий мозок (n=20)		76,88±4,83	3,10±0,59	19,81±3,29 (P1<0,01 P2<0,01 P3<0,02)	60,73±6,10 (P1<0,002 P2<0,001 P3<0,001)	19,46±4,22 (P1<0,05 P2<0,001 P3<0,001)	30,54±5,30 (P3<0,001)	44,32±4,88 (P1<0,05)	25,13±2,57 (P2<0,001 P3<0,001)	8,01±0,34 (P<0,02)	4,63±0,58 (P2<0,001 P3<0,001)
	периферич- на кров (n=34)	30,30±3,15	67,76±6,39	2,78±0,69	24,95±2,59 (P<0,01 P2<0,01 P3<0,001)	43,65±3,81 (P2<0,05)	31,40±3,26 (P2<0,001 P3<0,001)	33,20±2,81	33,20±6,16	30,94±4,54 (P2<0,05 P3<0,001)	7,81±0,68 (P<0,01)	3,30±0,26 (P2<0,001 P3<0,001)
ГМОд	кiстковий мозок (n=10)		76,16±4,96	3,26±0,17	35,42±5,29 (P2<0,001 P3<0,001)	42,27±6,92 (P2<0,001 P3<0,001)	22,31±2,33 (P1<0,01 P2<0,001 P3<0,001)	31,47±4,96 (P2<0,05 P3<0,001)	33,09±7,11 (P2<0,001)	33,45±4,37 (P3<0,001)	6,18±0,43 (P1<0,05)	2,44±0,33 (P<0,02 P2<0,01 P3<0,001)
	периферич- на кров (n=11)	43,79±7,03	65,92±7,14	2,73±0,42	53,08±7,05 (P1<0,002 P2<0,001 P3<0,001)	41,72±5,24 (P2<0,001 P3<0,001)	5,18±0,49 (P<0,001 P1<0,001 P2<0,001 P3<0,001)	7,62±0,54 (P<0,002 P1<0,001 P2<0,001 P3<0,001)	47,35±5,23 (P1<0,05 P2<0,001 P3<0,002)	45,03±6,07 (P<0,05 P1<0,01 P2<0,001)	4,14±0,49 (P<0,001 P1<0,01 P2<0,001 P3<0,001)	2,17±0,24 (P<0,01 P1<0,006 P2<0,001 P3<0,001)
ГМОд	периферич- на кров	116,32±25,56	88,67±4,81	2,94±0,54 (P2<0,02 P3<0,05)	43,48±4,35 (P2<0,001 P3<0,001)	37,04±2,56 (P1<0,001 P2<0,001 P3<0,001)	19,47±4,29 (P1<0,001 P2<0,001 P3<0,001)	26,37±6,67 (P2<0,001 P2<0,001 P3<0,001)	46,96±10,02 (P2<0,001 P2<0,001 P3<0,001)	26,36±1,19 (P2<0,001 P3<0,001)	6,77±1,33 (P3<0,003)	2,88±0,41 (P1<0,05 P2<0,001 P3<0,001)

ПРИМІТКИ: P - рівень вірогідності між показниками при ГМО і ГМОд

P1 - рівень вірогідності між показниками при ГМО (ГМОд) і ГАЛ

P2 - рівень вірогідності між показниками при ГМО (ГМОд) і бласттрансформованих лімфоцитах (48 годин стимуляції)

P3 - рівень вірогідності між показниками при ГМО (ГМОд) і бласттрансформованих лімфоцитах (72 годин стимуляції)

у функціональній активності ядерцевого апарату були зареєстровані при ГМол та ГЛЛ. При ГМол більш високий вміст ядерців S3 у бластних клітинах кісткового мозку та периферичної крові був характерним для першої групи ($(30,63 \pm 2,92) \%$ і $(7,43 \pm 0,59) \%$ проти $(13,99 \pm 1,75) \%$ ($P < 0,001$) і $(2,94 \pm 0,77) \%$ ($P < 0,001$) у другій групі, відповідно. Ядерця M1 у бластних клітинах кісткового мозку і периферичної крові першої групи складали $(37,57 \pm 4,42) \%$ і $(13,06 \pm 0,77) \%$ ($P < 0,05$) проти $(25,36 \pm 5,46) \%$ і $(2,17 \pm 0,31) \%$ у другій групі. Ці відмінності знайшли своє відображення також у показниках активності ЯОР. Так, сприятливою ознакою можна вважати низьку кількість Ag-ЯОР у клітинах кісткового мозку та периферичної крові ($5,67 \pm 0,63$ і $3,90 \pm 0,66$ проти $6,60 \pm 0,84$ і $4,39 \pm 0,33$, відповідно).

При ГЛЛ сприятливими прогностичними критеріями можна вважати: підвищення кількості ядерців S3 і M1 у бластних клітинах кісткового мозку ($54,14 \pm 3,66) \%$ проти $(10,37 \pm 0,76) \%$, $P < 0,001$ і $(56,22 \pm 4,60) \%$ проти $(25,89 \pm 1,83) \%$, $P < 0,001$, відповідно та периферичної крові ($(44,91 \pm 3,58) \%$ проти $(18,70 \pm 1,85) \%$, $P < 0,001$ і $(59,89 \pm 6,89) \%$ проти $(32,92 \pm 2,74) \%$, $P < 0,001$, відповідно); збільшення числа Ag-ЯОР як у клітинах кісткового мозку ($11,05 \pm 1,31$ проти $7,23 \pm 0,69$, $P < 0,01$), так і периферичної крові ($10,26 \pm 1,62$ проти $6,24 \pm 0,54$, $P < 0,02$).

Таким чином, функціональна активність ядерцевого апарату і проліферативна активність бластних клітин кісткового мозку та периферичної крові хворих на ГМЛ, ГММол і ГМол нижчі, ніж у бласттрансформованих лімфоцитах донорів. Найменша активність ядерцевого апарату клітин спостерігається у хворих на ГМол. Аналіз отриманих даних свідчить про те, що спираються

на показники ядерцевого апарату ще до початку терапії може йти мова про прогностичні ознаки для хворих на ГМЛ та ГЛЛ.

3. Зміни функціональної активності ядерцевого апарату бластних клітин хворих на ГМЛ у процесі лікування

З метою в'ясування можливості використання інформації про структурні особливості ядерцевого апарату бластних клітин хворих на ГМЛ для оцінки чутливості лейкоаного клону до цитостатиків, вивчали показники функціональної активності ядерцевого апарату бластних клітин периферичної крові 34 хворих ГМЛ у динаміці на фоні поліхіміотерапії.

Кров для дослідження забирали до початку лікування, через 24 години після початку терапії (1 доба), у середині (4 доба) і у кінці (8 доба) курсу. Хворих спостерігали на протязі двох курсів поліхіміотерапії. У кожному випадку аналізували від 50 до 100 клітин в залежності від того, як змінювалась кількість бластних клітин у периферичній крові хворих у процесі лікування. Підсумок по результатам терапії базувався на показниках клініко-гематологічного обстеження хворих.

У 26 хворих лейкоані клони виявились резистентними (перша група) та у 8 хворих чутливими до дії цитостатиків (друга група).

У процесі обстеження були вибрані найбільш інформативні показники функціональної активності ядерцевого апарату, а саме: величина НК, кількість Ag-ЯДР, великі та компактні ядерця.

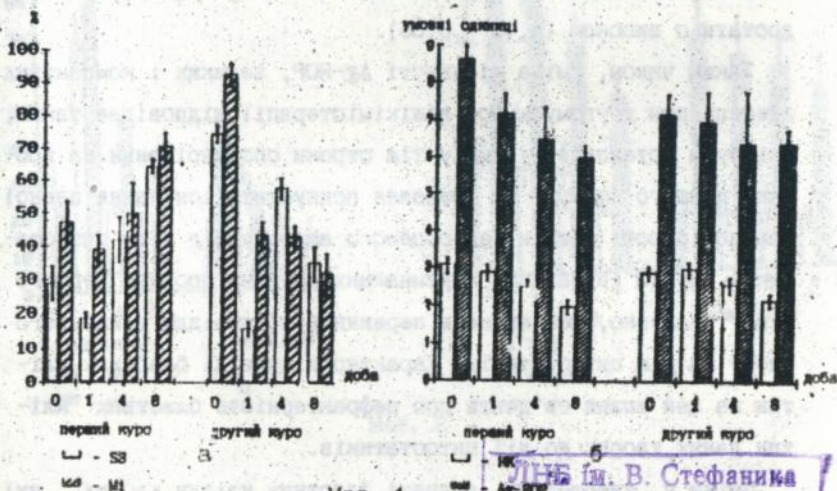
У хворих першої групи через добу після початку терапії у бластних клітинах число ядерець S3 і M1 падає від $(28,93 \pm 2,47) \%$ до $(18,75 \pm 1,98) \%$, $P < 0,05$ та від $(47,52 \pm 3,62) \%$

до $(39,27 \pm 3,75) \%$, $P < 0,01$ (мал. 1а).

У середині курсу ядерець S3 та M1 складали відповідно $((42,18 \pm 3,44) \%$, $P < 0,05$) і $((50,34 \pm 2,85) \%$, $P < 0,05$), що значно більше, ніж на першу добу після початку терапії і дещо вище ніж до початку лікування. Наприкінці першого курсу кількість ядерець M1 і S3 досягала $(70,75 \pm 5,76) \%$ і $(64,14 \pm 5,43) \%$, відповідно.

Зазначені структурні та кількісні зміни ядерець мали місце на фоні майже 50 % зниження НК ($P < 0,001$) і середнього числа Ag-ЯДР ($P < 0,001$) (мал. 1б).

Динаміка зміни показників ядерцевого апарату бластних клітин периферичної крові хворих на ГМЛ, які були рефрактерними до дії цитостатиків



Мал. 1.

Перед початком другого курсу хіміотерапії спостерігалась активна активізація ядерцевого апарату. Відновлювався практично до по-

чаткових значень НК. Він складав $2,87 \pm 0,21$. Це ж стосувалося і кількості Ag-позитивних ЯОР. На цей час він досягав $7,32 \pm 0,58$ на ядро (мал. 1а). Ядерця S3 та M1 складалі $(74,64 \pm 4,55) \%$ і $(92,76 \pm 5,89) \%$, відповідно (мал. 1б). Через 24 години від початку проведення другого курсу терапії знижувався вміст ядерця S3 $((15,97 \pm 6,87) \%, P < 0,001)$ і M1 $((45,75 \pm 4,05) \%, P < 0,001)$. На середині другого курсу кількість ядерця S3 у клітинах почала збільшуватися до $(57,69 \pm 6,87) \%, P < 0,001$, однак, наприкінці курсу знов знижувалася $(35,47 \pm 2,26) \%$ ($P < 0,001$ при порівнянні з початком другого курсу). Процентний вміст високоактивних ядерця M1 не змінювався.

Значення НК наприкінці першої доби від початку другого курсу збільшувалася до $3,02 \pm 0,28$, але потім, як і при першому курсі падала. На цей час кількість Ag-ЯОР залишалася достатньо високою $(6,42 \pm 0,35)$.

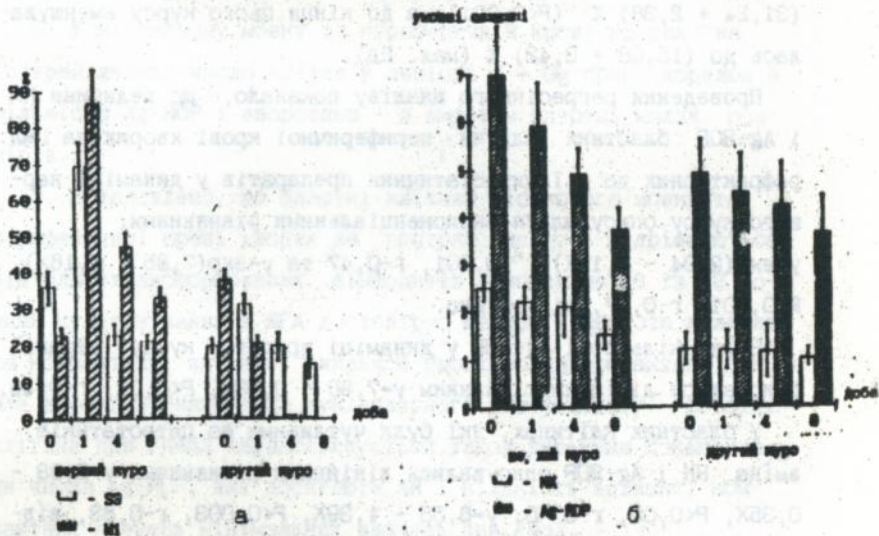
Таким чином, зміна кількості Ag-ЯОР, великих і компактних ядерця при другому курсі поліхіміотерапії відповідає таким, які були встановлені нами у тіж строки спостереження на протязі першого курсу. Це дозволяє припустити існування певної закономірності у зміні ядерцевого апарату під дією цитостатиків. Більш виражена картина цих змін на протязі першого курсу, напевно, пов'язана з первинною відповіддю лейкоаного клоу на дію цитостатиків. Характер відповіді бластних клітин на цей вплив свідчить про рефрактерність бластних клітин даних хворих до дії цитостатиків.

Зміни у сферцевому апараті бластних клітин хворих, які були чутливими до цитостатичної терапії, відрізнялися по відібраним показникам від таких у хворих першої групи.

Величина НК і середня кількість Ag-ЯОР знижувалася на

протязі першого курсу від відповідно $2,53 \pm 0,30$ до $1,46 \pm 0,29$ ($P < 0,05$) та $7,03 \pm 0,97$ до $3,72 \pm 0,45$ ($P < 0,01$) (мал. 2б). При цьому вже на кінець першої доби від початку лікування, на відміну від першої групи хворих, у 2 рази зростає процентний вміст ядерців S3 і у 3 рази ядерців M1. На середину першого курсу кількість ядерців M1 ($(47,37 \pm 3,68) \%$, $P < 0,001$) і S3 ($(23,00 \pm 3,08) \%$, $P < 0,001$), відповідно значно падала (мал. 2а).

Динаміка зміни показників ядерцевого апарату бластних клітин периферичної крові хворих на ГМЛ, які були чутливими до дії цитостатиків



Мал. 2

На кінець першого курсу кількість ядерців M1 знизилась до $(33,07 \pm 2,58) \%$ ($P < 0,002$ при порівнянні з початком лікування), ядерців S3 до $(21,34 \pm 2,16) \%$ ($P < 0,01$, відповідно).

Значення НК продовжували знижуватись як у перерві між курсами, так і на протяаі другого курсу поліхіміотерапії; на прикінці другого курсу досягало мінімальних значень - $1,04 \pm 0,22$. Паралельно знижувалася і кількість Ag-ЯОР: на прикінці - $3,59 \pm 0,71$ (мал. 2б). Ця кількість Ag-ЯОР була у два рази нижчою, ніж на прикінці другого курсу терапії в бластних клітинах хворих першої групи.

В такі ж строки спостереження продовжував зменшуватись і процентний вміст активних ядерць. Через добу від початку другого курсу ядерця М1 окладали ($20,69 \pm 1,60$) % ($P < 0,001$), а на його кінці - вони вже не зустрічалися. Що стосується кількості ядерць S3, то на першу добу вона зростала до ($31,24 \pm 2,38$) % ($P < 0,001$), а до кінця цього курсу зменшувалась до ($15,08 \pm 3,43$) % (мал. 2а).

Проведення регресійного аналізу показало, що величини НК і Ag-ЯОР бластних клітин периферичної крові хворих на ГМЛ рефрактерних до дії цитостатичних препаратів у динаміці першого курсу описувалися експоненціальними рівняннями: $y = \exp(3,04 - 0,12X)$, $P < 0,001$, $r = 0,47$ та $y = \exp(7,85 - 0,16X)$, $P < 0,001$, $r = 0,57$, відповідно.

Зміна кількості Ag-ЯОР у динаміці другого курсу терапії описується лінійним рівнянням $y = 7,60 - 0,33X$, $P < 0,02$, $r = 0,49$.

У бластних клітинах, які були чутливими до цитостатиків, зміна НК і Ag-ЯОР описувалися лінійними рівняннями $y = 2,88 - 0,35X$, $P < 0,05$, $r = 0,50$; $y = 6,55 - 1,39X$, $P < 0,003$, $r = 0,83$, відповідно.

У динаміці другого курсу поліхіміотерапії зміна Ag-позитивних ЯОР описувалася лінійним рівнянням $y = 5,01 - 0,50X$, $P < 0,003$, $r = 0,66$.

Таким чином, при вивченні функціональної активності ядер-

цевого апарату бластних клітин в різном чутливістю до цитостатиків було показано, що вже через добу від початку терапії по зміні кількості Ag-ЯОР, великих та компактних ядерць став можливим в великом міром вірогідності передбачати ефективність дії цитостатиків на лейкоаний клон.

ВИСНОВКИ

1. У бласттрансформованих лімфоцитах донорів на 48 та 72 години культивування в ФГА величина нуклеоярного коефіцієнта і кількість Ag-ЯОР позитивно корелює з числом клітин у періоді S + G₂.

2. У кістковому мозку та периферичній крові хворих на гострий лейкоз число клітин у періоді S + G₂ прямо корелює з кількістю Ag-ЯОР і зворотно - з вмістом ядерць малих розмірів.

3. Встановлено, що бластні клітини кісткового мозку та периферичної крові хворих на гострий лейкоз відрізняються від бласттрансформованих лімфоцитів донорів на 48 та 72 години культивування в ФГА достовірно меншою кількістю великих та компактних ядерць, низькою проліферативною активністю, але високими значеннями нуклеоярного коефіцієнту. Бластні клітини при ГМєЛД характеризуються також низькими показниками числа Ag-ЯОР, які досягають як і кількість великих, компактних ядерць мінімальних значень при ГМєЛ.

4. Високим вміст Ag-ЯОР великих та компактних ядерць у бластних клітинах хворих до початку терапії служить сприятливою прогностичною ознакою при ГЛД і несприятливою - при ГМєЛ.

5. У динаміці терапії гострого мієлобластного лейкозу

збільшення кількості великих та компактних ядерців у бластних клітинах хворих на першу добу і зниження їх числа на кінці як першого, так і другого курсів поліхіміотерапії, на фоні зниження нуклеолярного коефіцієнту і числа Ag-ЯОР свідчить про чутливість лейкозного клону до даних цитостатиків.

6. Про резистентність бластних клітин хворих на ГМЛ до дії цитостатиків свідчить достовірне зниження кількості великих та компактних ядерців на першу добу і зростання їх числа на кінець як першого, так і другого курсів на фоні зниження величини нуклеолярного коефіцієнту.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Влияние гелий-неонового лазерного излучения на форменные элементы крови детей с острым лейкозом. Гематология и переливание крови: Сб. - Киев: Здоров'я, 1993. - С.17-21 (соавт. Настенко Е.П.; Донская С.Б., Дроздова В.Д.).

2. Особенности ядрышкового аппарата бластных клеток больных острым лейкозом / Новое в гематологии и трансфузиологии: Тез. докл. 111 съезда гематол. и трансфузиол. Узбекистана, посвященного 50-летию института. Ташкент, 26-28 апреля 1990. - Ташкент, 1990. - ч.2. - С.65-66. (соавт. Уманский И.Ю.).

3. Структурно-функциональные особенности ядрышек и ядрышковых организаторов клеток при остром лейкозе / Международный конгресс молодых ученых по клинической медицине: Тез. докл., 10-14 марта 1992 г. - Киев, 1992. - С.32.

Андреева С.В. Структурно-функциональные особенности ядрышкового аппарата бластных клеток больных острым лейкозом.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологии

ческих наук по специальности 14.01.36 - гематология и переливание крови, Киевский НИИ гематологии и переливания крови, Киев, 1994.

Защищается рукопись, в которой содержится теоретическое исследование функционирования структур ядрышка бластных клеток костного мозга и периферической крови больных с различными вариантами острого лейкоза, а также сравнение показателей пролиферативной активности и различных структур ядрышкового аппарата. Установлено, что среднее количество Ag-положительных ЯОР прямо коррелирует с пролиферативной активностью. Изменения числа крупных и компактных ядрышек свидетельствуют о чувствительности бластных клеток больных ОМЛ к действию цитостатиков.

Andreyeva S.V. Structure-functional peculiarities of nucleolus apparatus of blast cells in patients with acute leukemia. Thesis for a candidat's degree on speciality 14.01.36 - hematology and blood transfusion, Kiev Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kiev, 1994. The competitor defends the typescript, that contains a theoretical investigation of bone marrow and peripheral blood blast cells nucleolus structures function in the patients with different acute leukemia variants, as well as comparison of proliferative activity and different nucleolus apparatus structures indices. It has been determined that an average number of Ag-positive NOR correlates directly with proliferative activity. The change of big and compact nucleoli numbers are evidence AML patients blast cells sensetivity to cytostatics effect.

Ключові слова: гострий лейкоз, бластні клітини, ядерцевий апарат, проліферативна активність.

AB 35.013