

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫРАЖЕННОСТИ МИЕЛОФИБРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

Долгих Т.Ю., Домникова Н.П., Качесов И.В., Мальцева Н.А., Шоленберг Е.В.

ФГБНУ «Институт молекулярной патологии и патоморфологии», Новосибирск, Россия (630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2), e-mail: pathol@inbox.ru

У больных хроническим миелолейкозом с помощью автоматизированного морфометрического способа оценивали выраженность миелофиброза и изменения структурно-функционального состояния эритрона. Миелофиброз характеризовали двумя параметрами: выраженность (начальный и выраженный миелофиброз) и распространенность (относительная площадь фиброзной ткани). Изучено 88 трепанобиоптатов подвздошной кости и мазков костного мозга. Исследовали две основные группы пациентов (1-я – дебют хронической фазы, 2-я – фаза акселерации и бластный криз) и одну дополнительную подгруппу (пациенты хронической фазы из 1-й и 2-й групп, ответившие на лечение). Обнаружено, что наибольшее угнетение эритрона отмечается при выраженном миелофиброзе, при этом степень его угнетения прямо коррелирует с относительной площадью фиброзной ткани на срезах в любую фазу хронического миелолейкоза. Самое выраженное подавление эритрона выявлено в продвинутые фазы хронического миелолейкоза, характеризующиеся наибольшей относительной площадью фиброзной ткани. У пациентов в хронической фазе, ответивших на лечение, угнетение эритрона отмечено только при наличии миелофиброза.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, миелофиброз, эритроцит, химиотерапия, способ автоматизированной морфометрической оценки

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF ERYTHRON DEPENDING ON THE SEVERITY OF MYELOFIBROSIS IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Dolgikh T.Y., Domnikova N.P., Kachesov I.V., Maltseva N.A., Sholenberg E.V.

Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk, Russia (630117, Novosibirsk, Timakov's Str., 2), e-mail: pathol@inbox.ru

In patients with chronic myeloid leukemia the severity of myelofibrosis was assessed using automated morphometric method, and also changes in structural and functional state of erythron were investigated. Bone marrow fibrosis is characterized by two parameters: the severity (initial and expressed bone marrow fibrosis) and the prevalence (the relative area of fibrous tissue on bone marrow sections). Bone marrow trephine biopsies obtained from 88 patients were studied. We studied two groups of patients (1st – the debut of chronic phase, 2nd – accelerated phase and blast crisis), and one additional subgroup (patients with chronic phase from 1st and 2nd groups who responded to treatment). It was found that the greatest inhibition of erythron was observed in cases with expressed bone marrow fibrosis, the degree of its suppression was directly correlated with the prevalence of bone marrow fibrosis in any phase of chronic myeloid leukemia. The most pronounced suppression of erythron was detected in advanced phases of chronic myeloid leukemia, characterized by the highest relative area of fibrous tissue. The inhibition of erythron in chronic-phase patients responding to treatment was observed only in patients with bone marrow fibrosis.

Keywords: chronic myeloid leukemia, erythron, chemotherapy, method of automated morphometric assessment of bone marrow fibrosis

У пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) в ряде случаев развивается анемия, чаще – у пациентов в возрасте старше 60 лет, лиц женского пола, после получения иматиниба в дозе 400 мг в сутки и более, при средней или высокой группах риска по индексу Sokal [9]. Гематологическая токсичность иматиниба наблюдается более чем у половины пациентов [9, 10]. Развитие анемии выявлено у 230 (68%) из 338 больных ХМЛ, получавших иматиниб [9]. Выявлена тенденция к снижению частоты полных «цитогенетических ответов» у пациентов с анемией по сравнению с больными, у которых анемия не выявлялась

(соответственно 68 против 77%).

Остается актуальным комплексное изучение механизмов, приводящих к развитию анемии, в том числе патоморфологических аспектов данной проблемы. В ряде исследований установлены взаимосвязи кроветворных клеток и костномозгового микроокружения при лимфопролиферативных заболеваниях [1 – 4].

Исследований, посвященных структурно-функциональным изменениям эритрона и их взаимосвязям с развитием миелофиброза, как одной из составляющих костномозгового микроокружения, у пациентов с ХМЛ недостаточно [12, 14]. Как правило, представленные в этих работах результаты носят полуколичественный характер, что затрудняет понимание патогенеза анемии.

Цель исследования – с помощью комплексного клиничко-морфологического анализа оценить структурно-функциональные особенности эритрона при развитии МФ у пациентов в различные фазы ХМЛ и в динамике химиотерапии.

Материал и методы исследования

Проведено клиничко-морфологическое обследование 88 пациентов с ХМЛ (52 мужчины, 36 женщин в возрасте от 16 до 82 лет, средний возраст – $55,8 \pm 1,9$ лет), находившихся на лечении в ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница» с 2006 по 2013 годы.

Всех пациентов разделили на две группы. 1-я группа – дебют хронической фазы ХМЛ или потеря полного гематологического ответа ($n=53$). У 60% пациентов (32 человека) этой группы потеря полного гематологического ответа наступила после одной линии химиотерапии (гидроксикарбамид+интерферон альфа-2 β), у 15% пациентов (8 человек) – после двух линий (гидроксикарбамид+интерферон альфа-2 β , иматиниб). 2-я группа – продвинутые фазы (фаза акселерации и фаза бластного криза) ХМЛ ($n=35$). Из пациентов 1-й группы была выделена дополнительная подгруппа (19 человек), в которую вошли пациенты, ответившие на лечение (полный гематологический ответ, полный цитогенетический ответ, большой цитогенетический ответ). Из них одну линию химиотерапии (гидроксикарбамид+интерферон альфа-2 β) получили 58% больных (11 человек), две (гидроксикарбамид+интерферон альфа-2 β , иматиниб) – 42% пациентов (8 человек).

Контрольную группу составили 50 человек без гематологических заболеваний и анемического синдрома (30 мужчин, 20 женщин, средний возраст – $44,73 \pm 2,48$ лет), у которых исследованы показатели периферического звена эритрона. У 10 пациентов с целью исключения диагноза гемобластоза проводили цитологическое исследование костномозгового компартмента эритрона и патоморфологическое изучение трепанобиоптатов подвздошной кости.

Диагноз ХМЛ устанавливали на основании клинико-гематологических данных (лейкоцитоз, миелоцитарный сдвиг, эозинофильно-базофильная ассоциация, анемия, тромбоцитоз или тромбоцитопения, гепато- и спленомегалия), цитогенетических и молекулярно-генетических исследований крови и костного мозга, выявляющих Ph-хромосому и/или слитный ген BCR-ABL [6].

Результаты терапии ХМЛ оценивали согласно критериям международной организации European Leukemia Net 2009 г. [8].

Наличие анемии у пациентов регистрировали при уровне гемоглобина в периферической крови менее 120 г/л. Для определения степени тяжести анемии использовали классификацию ВОЗ: легкая анемия – $Hb \geq 95$ г/л, умеренная – 80 – 94 г/л, выраженная – 65 – 79 г/л и тяжелая – менее 65 г/л.

Клинико-морфологические исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинской Декларации (2000 г.)

Для исследования показателей центрального и периферического звеньев эритрона в динамике химиотерапии использовали мазки периферической крови и аспираты костного мозга, окрашенные по методу Романовского-Гимзы. Показатели центрального звена эритрона оценивали по 400 ядродержащих клеток костного мозга.

Степень МФ устанавливали согласно шкале Европейского консенсуса [13]. При этом миелофиброз 1-й степени расценивали как начальный фиброз, а МФ 2-й и 3-й степеней – как выраженный [12].

Автоматизированное морфометрическое исследование МФ проводили с использованием программы анализа изображений AxioVision 4.6, камеры Axio Cam, микроскопа Zeiss, компьютера. В парафиновых срезах трепанобиоптатов подвздошной кости, толщиной 4 мкм, импрегнированных серебром по методу Гомори и окрашенных по методу ван Гизона, при увеличении в 200 раз измеряли абсолютную площадь фиброзной ткани. Абсолютную площадь гемопоэтической ткани измеряли в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Изучали все костномозговые полости одного среза, что соответствовало 5 – 7 полям зрения микроскопа и 20 – 30 полям зрения камеры (в зависимости от размера среза). Площадь одного поля зрения камеры составляла 364 000 мкм² (0,7 мм²). Суммарную абсолютную площадь фиброзной ткани в пределах одного среза получали путем сложения площадей фиброзной ткани во всех полях зрения камеры. Аналогичным образом получали суммарную абсолютную площадь гемопоэтической ткани. Затем вычисляли относительную площадь фиброзной ткани: $S_{\text{отн.фибр.тк.}} = S_{\text{фибр.тк.}} / S_{\text{гемопозт.тк.}} \times 100\%$, где $S_{\text{фибр.тк.}}$ – суммарная абсолютная площадь фиброзной ткани, $S_{\text{гемопозт.тк.}}$ – суммарная абсолютная площадь гемопоэтической ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS (версия 17.0). Результаты представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее арифметическое значение, σ – стандартное отклонение, а также $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – ошибка средней арифметической. Проверку соответствия выборок анализируемых данных нормальному распределению проводили по критерию Шапиро-Уилка. Средние значения в разных выборках сравнивали с помощью U-теста по методу Манна и Уитни (непараметрического теста) и критерия Стьюдента (t-критерий). Связь между двумя переменными определяли с помощью коэффициентов корреляции Пирсона и Спирмана.

Результаты исследования и их обсуждение

У пациентов 1-й и 2-й групп наименьшее общее число эритроидных клеток в костном мозге (по данным миелограммы), наименьший уровень эритроцитов в периферической крови и наименьший уровень гемоглобина выявлены при выраженном МФ, наибольшие значения данных показателей обнаружены у пациентов без МФ (табл. 1).

Таблица 1

Показатели эритрона в 1-й и 2-й группах пациентов при миелофиброзе различной выраженности ($M \pm m$)

МФ	Общее число эритроидных клеток в костном мозге, по данным миелограммы, %		Эритроциты в периферической крови, $\times 10^9/\text{л}$		Гемоглобин, г/л	
	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа
1. МФ-0, n=25/17*	11,9 \pm 2,3	16,2 \pm 5,9	4,4 \pm 0,3	3,9 \pm 1,8	125,6 \pm 6,2	107,3 \pm 6,2
2. Начальный МФ, n=13/8	7,8 \pm 1,6	13,4 \pm 4,4	4,0 \pm 0,3	3,4 \pm 0,3	114,5 \pm 7,0	100,1 \pm 9,8
3. Выраженный МФ, n=15/10	6,0 \pm 1,2	5,9 \pm 1,9	3,9 \pm 0,2	2,9 \pm 0,3	107,3 \pm 6,9	87,1 \pm 9,4
4. Контрольная группа, n=10	20,6 \pm 2,2	20,6 \pm 2,2	5,4 \pm 1,1	5,4 \pm 1,1	134,5 \pm 5,3	134,5 \pm 5,3
p	p _{1,2} , p _{2,3} , p _{1,3} , p _{1,4} , p _{2,4} , p _{3,4} <0,05	p _{1,2} , p _{2,3} , p _{1,3} , p _{1,4} , p _{2,4} , p _{3,4} <0,05	p _{1,2} , p _{2,3} , p _{1,3} , p _{1,4} , p _{2,4} , p _{3,4} <0,05	p _{1,2} , p _{2,3} , p _{1,3} , p _{1,4} , p _{2,4} , p _{3,4} <0,05	p _{1,2} , p _{2,3} , p _{1,3} , p _{1,4} , p _{2,4} , p _{3,4} <0,05	p _{1,2} , p _{2,3} , p _{1,3} , p _{1,4} , p _{2,4} , p _{3,4} <0,05

Примечание. МФ – миелофиброз; * - n представлено в виде a/b, где a – число пациентов в дебюте хронической фазы ХМЛ или при потере полного гематологического ответа, b – число больных в продвинутые фазы ХМЛ.

Все показатели эритрона в 1-й и во 2-й группах оказались меньше, чем в группе контроля. Уровень гемоглобина у пациентов 2-й группы был достоверно меньше, чем у

пациентов 1-й группы вне зависимости от наличия МФ и степени его выраженности ($p < 0,05$).

У больных 1-й группы обнаружена обратная корреляционная связь между Сотн.фибр.тк. и уровнем гемоглобина как при начальном ($r = -0,477$, $p = 0,048$), так и при выраженном ($r = -0,432$, $p = 0,031$) МФ. Во 2-й группе пациентов также выявлена обратная корреляция между Сотн.фибр.тк. и уровнем гемоглобина как при начальном ($r = -0,506$, $p = 0,032$), так и выраженном ($r = -0,834$, $p = 0,005$) МФ.

Показано, что в 1-й группе Сотн.фибр.тк. у больных с начальным МФ при тяжелой анемии больше, чем при отсутствии анемии и при анемии легкой степени (табл. 2). Во всех случаях анемии Сотн.фибр.тк. у больных с выраженным МФ достоверно больше, чем у больных с начальным МФ.

У всех пациентов 2-й группы обнаружена анемия. Наибольшая Сотн.фибр.тк. как у больных с начальным МФ, так и выраженным МФ была выявлена при анемии тяжелой степени, наименьшие аналогичные показатели – при анемии легкой степени (табл. 3). Сотн.фибр.тк. у больных с выраженным МФ превышала таковую у больных с начальным МФ при анемии любой степени выраженности.

Таблица 2

Относительная площадь фиброзной ткани у больных с начальным МФ и выраженным МФ в дебюте хронической фазы ХМЛ и при потере полного гематологического ответа в условиях анемии различной степени выраженности ($M \pm \sigma$)

Анемия	Относительная площадь фиброзной ткани, %		p'
	при начальном МФ	при выраженном МФ	
1.Отсутствует, n=19	6,9±20,1	7,9±20,1	p'=0,128
2.Лёгкая, n=28	9,4±15,1	19,3±29,6	p'=0,012
3.Умеренная, n=16	10,1±13,3	24,5±21,4	p'=0,033
4.Выраженная, n=10	12,5±12,4	45,4±23,4	p'=0,005
5.Тяжёлая, n=8	15,6±12,2	62,3±24,6	p'=0,007
p	p _{1,2} , p _{1,3} , p _{1,4} , p _{2,3} , p _{2,4} , p _{3,4} , p _{3,5} , p _{4,5} ≥ 0,05 p _{1,5} = 0,018 p _{2,5} = 0,032	p _{1,2} , p _{1,3} , p _{1,4} , p _{2,3} , p _{2,4} , p _{2,5} , p _{3,4} , p _{3,5} , p _{4,5} ≥ 0,05 p _{1,5} = 0,048	

Таблица 3

Относительная площадь фиброзной ткани у больных с начальным МФ и выраженным МФ в продвинутой фазе ХМЛ при анемии различной степени выраженности ($M \pm \sigma$)

Анемия	Относительная площадь фиброзной ткани, %		p'
	при начальном МФ	при выраженном МФ	
1.Легкая, n=22	6,4±7,0	18,5±23,1	p'=0,004
2.Умеренная, n=6	10,5±18,9	34,7±53,3	p'=0,039
3.Выраженная, n=4	26,3±45,6	51,7±49,6	p'=0,002
4.Тяжелая, n=3	43,5±40,3	65,4±29,8	p'=0,036

p	$p_{1,2}=0,362$ $p_{1,3}, p_{1,4}, p_{2,3}, p_{2,4}, p_{3,4}<0,05$	$p_{1,2}=0,110$ $p_{1,3}, p_{1,4}, p_{2,3}, p_{2,4}, p_{3,4}<0,05$	
---	---	---	--

У пациентов дополнительной подгруппы, ответивших на лечение, все изменения эритрона относительно МФ были аналогичны изменениям, характерным для пациентов 1-й и 2-й групп. В то же время у больных этой подгруппы без МФ общее число эритроидных клеток в костном мозге и число эритроцитов в периферической крови не отличались от нормы.

Одно из объяснений угнетения эритрона при развитии МФ заключается в вытеснении фиброзными волокнами и опухолевой тканью гемопоэтических клеток. По аналогии с лимфопролиферативными заболеваниями при опухолевом поражении костного мозга развивается «синдром занятого места» [5, 7] с проявлениями в виде гипоплазии нормальных ростков кроветворения.

Нами впервые установлено, что у пациентов в фазе акселерации и фазе бластного криза при выраженном МФ происходит наибольшее угнетение эритрона. У пациентов хронической фазы, ответивших на лечение, показатели эритрона были меньше таковых в группе контроля только в случае наличия МФ. Отсутствие МФ у пациентов хронической фазы, ответивших на лечение, ассоциировано с нормальными показателями эритрона.

Угнетение эритропоэза ни во всех случаях объясняется исключительно механическим вытеснением нормального кроветворения. Среди механизмов, негативно влияющих на костномозговое звено эритрона, ведущую роль играют провоспалительные цитокины, такие как сосудисто-эндотелиальный фактор роста [15] и ИЛ-6 [11], индуцирующие неэффективный эритропоэз. По мере прогрессирования заболевания увеличивается концентрация провоспалительных цитокинов [15], что и объясняет более выраженное угнетение эритрона и наличие анемии у всех больных фазы акселерации и фазы бластного криза.

Таким образом, анализ состояния эритрона в мазках костного мозга, трепанобиоптатах подвздошной кости и периферической крови выявил его взаимосвязи с выраженностью МФ. Наибольшее угнетение эритрона отмечается при выраженном МФ, при этом степень его угнетения прямо коррелирует с распространенностью МФ в любую фазу ХМЛ. Самое выраженное подавление эритрона происходит в продвинутые фазы ХМЛ, характеризующиеся наибольшей Sotn.фибр.тк. У пациентов в хронической фазе ХМЛ, ответивших на лечение, угнетение эритрона отмечено только при наличии МФ.

Использование автоматизированной морфометрической оценки МФ позволяет объективно оценить патогенетическую роль МФ в изменениях эритрона, в том числе в

развитии анемии у пациентов с ХМЛ.

Список литературы

1. Домникова Н.П., Долгих Т.Ю., Дьячкова Ю.А. и др. Исследование клинической и лабораторной значимости миелофиброза при множественной миеломе // Бюллетень СО РАМН. – 2014. – Т.34, № 6. – С. 76-81.
2. Домникова Н.П., Непомнящих Г.И., Айдагулова С.В. и др. Морфометрический анализ трепанобиоптатов при агрессивных и индолентных неходжкинских лимфомах // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151, № 6. – С. 716-720.
3. Домникова Н.П., Непомнящих Г.И., Бакарев М.А. и др. Структурный анализ трепанобиоптатов при агрессивных и индолентных неходжкинских лимфомах // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 9. – С. 57-61.
4. Домникова Н.П., Непомнящих Г.И., Долгих Т.Ю. и др. Морфологическое исследование трепанобиоптатов при неходжкинских лимфомах // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – № 3. – С. 64-68.
5. Морозова В.Т. Лейкозы – болезни стромы кроветворных органов (гипотеза) // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 6. – С. 3-13.
6. Программное лечение заболеваний системы крови: Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови / Под ред. В.Г.Савченко. – М.: Практика, 2012. – 1056 с.
7. Туркина А.Г. Хронический миелолейкоз // Руководство по гематологии в 3 т. / Под ред. А.И.Воробьева. – М.: Ньюдиамед, 2002. – Т. 1. – С. 251-256.
8. Barosi G., Bordessoule D., Briere J. et al. Response criteria for myelofibrosis with myeloid metaplasia: results of an initiative of the European Myelofibrosis Network (EUMNET) // Blood. – 2005. – Vol. 106. – P. 2849–2853.
9. Cortes J., O'Brien S., Quintas A. et al. Erythropoietin is effective in improving the anemia induced by imatinib mesylate therapy in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase // Cancer. – 2004. – Vol. 100, № 11. – P. 2396-2402.
10. Huang X., Patel S., Ahmed N. et al. Severe toxicity of skin rash, fever and diarrhea associated with imatinib: Case report and review of skin toxicities associated with tyrosine kinase inhibitors // Drug Des. Devel. Ther. – 2009. – No 2. – P. 215-219.
11. Reynaud D., Pietras E., Barry-Holson K. et al. IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development // Cancer Cell. – 2011. – Vol. 20, № 5. – P. 661-673.

12. Tadmor T., Shvidel L., Aviv A. et al. Significance of bone marrow reticulin fibrosis in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis: A study of 176 patients with prognostic implications // *Cancer*. – 2013. – Vol. 119, No 10. – P. 1853-1859.
13. Thiele J., Kvasnicka H.M., Facchetti F. et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity // *Haematologica*. – 2005. – Vol. 90. – P. 1128-1132.
14. Thiele J., Kvasnicka H.M., Titius B.R. et al. Histological features of prognostic significance in CML: An immunohistochemical and morphometric study (multivariate regression analysis) on trephine biopsies of the bone marrow // *Ann. Hematol.* – 1993. – Vol. 66. – P. 291-302.
15. Vidović A., Janković G., Tomin D. et al. Prognostic significance of cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the course of chronic myeloid leukaemia // *Srp. Arh. Celok. Lek.* – 2009. – Vol. 137, № 7-8. – P. 379-383.

Рецензенты:

Гуляева Л.Ф., д.б.н., профессор, зав. лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБНУ «НИИ молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск;

Сидорова Л.Д., д.м.н., профессор, профессор кафедры внутренних болезней Новосибирского государственного медицинского университета МЗ РФ, г. Новосибирск.