

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

**МОРФОЛОГИЯ КЛЕТОК КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ РАЗВИТИИ
ОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССОВ В СИСТЕМЕ КРОВИ**

Магистерская диссертация

обучающегося по направлению подготовки 06.04.01 Биология

очно-заочной формы обучения, группы 07001545

Леонтьевой Юлии Витальевны

Научный руководитель:
д.б.н., проф. Скоркина М.Ю.,

Рецензент
Биолог клинико-диагностической лабо-
ратории Белгородской областной кли-
нической больницы Святителя Иоасафа,
кандидат биологических наук
Черкашина О.В.

БЕЛГОРОД 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Морфология клеток крови в норме	7
1.2. Морфологические особенности клеток крови при развитии лейкозов	16
1.3. Классификация лейкозов.....	22
1.4. Использование методов компьютерной морфометрии в гематологии	28
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1. Организация эксперимента и забор материала	31
2.2. Гематологические исследования	31
2.3. Приготовление и окраска мазков крови.....	33
2.4. Компьютерная морфометрия мазков крови.....	34
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
3.1. Морфофизиологическая характеристика эритроидной популяции при развитии пролиферативных процессов в системе крови	35
3.2. Особенности лейкоформулы при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови.....	42
3.3. Морфология клеток крови при лейкозах	44
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
ВЫВОДЫ	52
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	54

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Современный этап развития в изучении физиологии клеток крови связан с использованием новейших морфометрических и функциональных подходов, основанных на достижениях биомедицины. Морфология клеток крови выступает одним из ключевых индикаторов, изменяющихся в соответствии со стадиями жизненного цикла клетки. В связи с чем, изучение морфологии клеток крови в норме и при патологии приобретает особую актуальность, так как этот параметр имеет важное диагностическое и прогностическое значение при диагностике и терапии опухолевых процессов в системе крови. Согласно данным литературы о морфологическом развитии опухолей на основе исследования их жизненного цикла, выявлены многочисленные патологии митозов на стадии метафазы (Казанцева, 1981), нарушения в функционировании нормальных генов с вовлечением протоонкогенов (Ковалева, 1990). На терминальной стадии развития острых лимфобластных и миелоидных лейкозах, практически в 95-98% случаев, описаны механизмы формирования патологических хромосом, например, «филадельфийская хромосома» (Ph-хромосома), которая присутствует в аномальных бластах (Hazlehurst, 2009).

Степень разработанности темы исследования.

В настоящее время изучены различные аспекты развития опухолевых процессов в системе крови (Виноградская, 2002; Погорелов, 2006 и др.). В научной литературе имеются работы посвященные онкологии в гематологии, где описаны морфологические изменения органов (Воробьев, 2005), количественные особенности клеток крови и костного мозга (Алейникова, 2002), нарушение тех или иных процессов в жизнедеятельности клетки, однако отсутствуют данные о морфометрических параметрах бластных форм в периферическом русле и костном мозге. Разработка цитобиологических подходов в диагностике патофизиологических состояний, предопределила развитие нового направления, устанавливающего соответствие между формой клетки и типом воздействия на нее (Нагаева и др., 2001), причем независимо от природы дезорганизации и трансформации клеток крови нарушение рельефа поверхности и формы приводят к функциональной неполноценности клетки (Шмаров и др.,

2001). Идея об однозначном соответствии распределения клеток по размерам и форме легла в основу разработки нового направления диагностики заболеваний по размерам и форме клеток – дифференциальной диагностики с последующим наблюдением за результатом развития репаративного или патологического процессов (Сыроешкин и др., 2002). Согласно данным ряда работ, в основу создания моделей, позволяющих раскрывать фундаментальные аспекты патогенеза многих функциональных состояний и нарушений в системе крови, положены данные многомерного анализа клеток крови (Соколинский, Пятницкий, 1999; Муравьев и др., 2001). В современной гематологии для определения количества и формы клеток крови используют анализаторы, работающие по принципу кондуктометрического подсчета клеток, а также использующие оптические и радиочастотные детекторы (Chattopadhyay, Roederer, 2012).

Одним из современных и перспективных методов исследования морфологии и цитоархитектоники клеток крови является инструментарий на базе атомно-силовой микроскопии (АСМ), который позволяет получать изображения клеток с высоким пространственным разрешением (Bischoff, Hein, 2003; Alessandrini, Facci, 2005). АСМ позволяет исследовать микро- и наномеханические свойства клеточных структур, пространственное распределение локального модуля упругости в пределах одной клетки (Hansma, 2001).

Целью выполненного исследования явилось изучение морфологических особенностей клеток крови в норме и при развитии опухолевых процессов в системе крови.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выполнить морфофизиологические исследования эритроцитарной популяции в норме и при развитии острых и хронических типов лейкоза, лимфомы.
2. Построить и проанализировать кривые Прайс-Джонса в норме и при онкопатологии в системе крови.
3. Изучить особенности лейкоформулы в норме и при онкопатологии в системе крови.

4. Дать морфологическую характеристику патологическим бластным формам.

Объект исследования: лейкоциты и эритроциты в норме и при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови.

Предмет исследования: морфометрические характеристики клеток крови в норме и при развитии опухолевых процессов.

Научная новизна.

Впервые выполнен анализ морфофизиологических параметров эритроцитарной популяции в крови пациентов больных острыми и хроническими типами лейкоза, а также лимфомой. В результате проведенных экспериментов установлено, что развитие острых форм лейкоза сопровождается снижением числа эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови. Адаптационный потенциал эритроцитарной популяции, направленный на поддержание кислородного гомеостаза организма реализуется в основном за счет микроцитарной субпопуляции, которая активируется на фоне сфероцитоза нормоцитов. В целом функциональная активность эритроидной системы снижена и характеризуется анизоцитозом.

Развитие лимфомы сопровождается глубокой анемией, протекающей на фоне микроцитоза.

Выявлены патологии митоза в бластных формах миелоидного ростка кроветворения. Для данного типа лейкоза характерно присутствие моноцентрических форм митоза, а так же присутствие бластов с вакуолизацией цитоплазмы.

Методы исследования.

В работе использованы следующие методы: рутинные методы приготовления и окраски мазков крови, компьютерная цитоморфометрия, методы световой микроскопии, методы вариационной статистики.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании проведенных исследований получены новые экспериментальные данные о влиянии опухолевых процессов на эритроидную популяцию клеток крови человека. Полученные результаты расширяют и дополняют современные представления о

протекании миелоидных и лимфоидных злокачественных новообразований, а также могут служить для оценки качества проводимой терапии.

Структура работы. Магистерская диссертация состоит из введения, 4 глав основной части (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов исследования) и 10 подразделов, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы. Работа изложена на 66 страницах машинописного текста, включает в себя 6 таблиц и 10 рисунков. Список литературы включает в себя 113 наименований, из которых 97 отечественных и 16 иностранных источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Морфология клеток крови в норме

Одним из центральных свойств системы кроветворения является непрерывный процесс клеточного обновления, который обеспечивают стволовые клетки и стромальное микроокружение. Однако в целом, систему крови характеризует большая лабильность при сохранении постоянства количественного и качественного состава её отдельных звеньев. Гемопоэтические клетки отличаются большим разнообразием как по ультраструктуре, функциональным свойствам, так и по степени зрелости. В каждой из этих линий можно выделить несколько классов клеток (Козинец, 1998).

Противоречия о происхождении клеток крови были разрешены экспериментальными работами на физиологической основе. Согласно унитарной теории кроветворения, сформулированной А. А. Максимовым (1909), источником всех линий кроветворения в костном мозге являются «родоначальные клетки» (Мяделец, 2007). Довольно долгое время не существовало единого термина для их обозначения, однако в настоящее время они носят название «плюрипотентные стволовые кроветворные клетки» (ППСК), трансформирующиеся в костном мозге в «мультипотентные стволовые клетки» (Чеснокова, 2012.).

В настоящее время существует 6 клеточных линий дифференцировки (рис.1). К ним относят мегакариопоэз, с образованием тромбоцитов; эритроцитопоэз результатом которого являются эритроциты, моноцитопоэз с образованием моноцитов, а также три линии, объединенные в рамках гранулоцитарной дифференцировки (гранулоцитопоэз), продуцирующие нейтрофилы, базофилы и эозинофилы. Лимфопоэз объединяет две линии дифференцировки: Т- и В-лимфопоэз (Глузман, 2014).

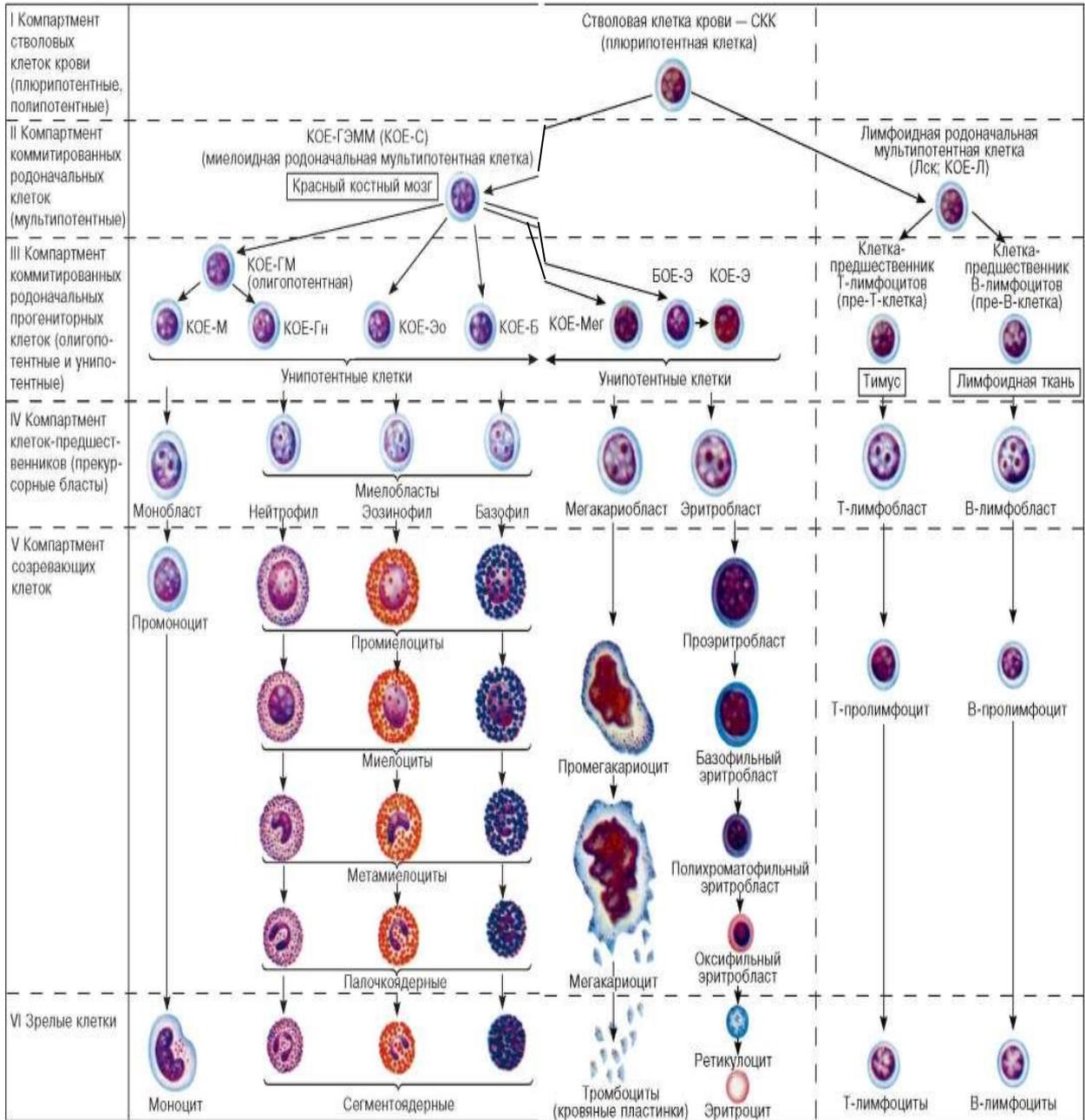


Рис. 1. Постэмбриональный гемопоэз, окраска азуром II-эозином (по Н. А. Юриной, 2012).

К I классу относят полипотентные гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), которые обладают свойством дифференцироваться в различные клеточные популяции.

II класс включает полустволовые или частично детерминированные клетки-предшественники, способность к дифференцировке у которых ограничена;

К III классу принадлежат унипотентные (коммитированные) родоначальные клетки, каждая из которых дает начало только одному виду форменных элементов крови.

IV класс образуют бласты. Хотя морфологически все клетки этого класса сходны друг с другом, их можно идентифицировать при использовании стандартных гематологических методов окраски, не прибегая к выявлению иммуноцитохимических маркеров. Данная группа характеризуется такими особенностями как – явно выраженное клеточное ядро, имеющее несколько ядрышек и занимающее большую часть клетки.

V класс представлен дифференцирующимися и созревающими клетками, а VI – составляют зрелые клетки крови, имеющие ряд морфологических особенностей (Чеснокова, 2012).

1.1.1. Морфологические особенности клеток эритроцитарного ряда

К морфологически распознаваемым клеткам эритроцитарного ряда относятся: эритробласт, пронормоцит, нормоцит, ретикулоцит и эритроцит (Захаров, 2002)

Эритробласт представляет собой крупную клетку правильной формы диаметром от 20 до 25 мкм. Находящееся в центре красно-фиолетовое округлое ядро занимает значительную часть клетки и содержит от 1 до 5 нуклеол. Хроматин ядра имеет нежно – сетчатую структуру, а цитоплазма интенсивно базофильна без признаков зернистости (Трошкина, 2007).

Пронормоцит характеризуется наличием большого ядра и отсутствием ядрышек. В процессе дифференцировки диаметр клеток уменьшается до 18 – 22 мкм. Вследствие присутствия свободных рибосом цитоплазма имеет синюю окраску без включений (Волкова, 2007).

Нормоцит представляет собой клетку несколько меньшего размера – от 8 до 12 мкм. В зависимости от степени насыщения их цитоплазмы гемоглобином, различают базофильный, полихроматофильный и оксифильный нормоциты (Липунова, 2004).

К *базофильным нормоцитам* относятся активно делящиеся клетки крови размером 12 – 16 мкм. Благодаря значительному содержанию полисом, способных синтезировать гемоглобин, цитоплазма имеет резко базофильную окраску. Относительно своих предшественников данный вид нормоцитов характеризует-

ся наличием мелкого ядра, которое содержит умеренно конденсированный хроматин и ядрышки (Погорелов, 2016).

Полихроматофильный нормоцит характеризуется более мелкими размерами (10-12 мкм) и компактным ядром. Отличительной особенностью этого вида клеток, можно считать исчезновение ядрышка и более грубую структуру хроматина, который представлен в виде глыбок, вследствие чего ядро приобретает колесовидную структуру. При использовании гематологических красителей цитоплазма окрашивается неоднородно, т.е. воспринимает и кислые, и основные красители. Полихроматофильный нормоцит является последней клеткой ряда, которая способна к делению (Максимович, 2010).

Дальнейшее созревание нормоцита заключается в потере им ядра. Поэтому, образовавшийся, путем дифференцировки из полихроматофильного, *оксифильный нормоцит*, характеризуется полной его утратой путем распада на отдельные частички (кариорексис), которые затем либо выталкиваются из клетки, либо растворяются в ней (кариолиз). В цитоплазме клеток содержится небольшое количество органелл, но значительная концентрация гемоглобина, что обуславливает ее оксифильную окраску (Дроздов, 2008).

Молодые формы, являющиеся неотъемлемой частью нормальной популяции эритроцитов, носят название *ретикулоциты*. В данных клетках сохраняются рибосомы, митохондрии, центриоль и остатки комплекса Гольджи, а оранжево-розовая цитоплазма, почти целиком заполнена гемоглобином. Вышеперечисленные органеллы способны формировать зернистые и сетчатые структуры, которые выявляются при определенной суправитальной окраске. Стандартная гематологическая окраска азуром II-эозином показывает отличительную черту ретикулоцитов, относительно основной массы эритроцитов т.к. они проявляют полихроматофилию и окрашиваются в серо-голубой цвет (Юрина, 2012).

В научной литературе имеются данные о наличии четырех стадий созревания ретикулоцитов в зависимости от характера зернистости:

I – зернистость в виде клубка;

II – в виде сети;

III – в виде неполной сети;

IV – в виде отдельных гранул (формула Гельмейера) (Липунова, 2007).

Эритроциты – наиболее многочисленные форменные элементы крови. В периферической крови человека – имеют преимущественно форму двояковогнутого диска с более светлой окраской их центральной части по сравнению с периферической. Зрелые эритроциты полностью лишены не только ядра, но и всех прочих органелл (Луговская, 2011). Размеры эритроцита весьма изменчивы, но в большинстве случаев средняя величина диаметра у взрослого человека составляет 7,5—8,3 мкм, максимальная толщина — 2,1 мкм, площадь поверхности — 145 мкм², объем — 86 мкм³. Форменные элементы диаметр которых свыше 9 мкм классифицируют как макроциты, а клетки с диаметром 6 мкм и менее – микроциты (Комарова, 2013). Цитоплазма эритроцита на 96% заполнена гемоглобином (Волкова, 2013).

Зрелые эритроциты носят название – дискоциты. При их старении форма данных элементов крови способна меняться в двух направлениях. В первом случае, при так называемом кренировании, дискоциты сначала превращаются в эхиноциты – эллипсоидные клетки с шиповидными выростами цитоплазмы, а затем в сфероциты — клетки круглой формы без шипов. Либо двояковогнутая форма клетки меняется путем инвагинации участков плазмолеммы на вогнуто-выпуклую (куполообразную), образуя при этом стоматоцит (Кузнецов, 2016). Одним из проявлений процессов старения эритроцитов является их гемолиз, сопровождающийся выходом гемоглобина; при этом в крови обнаруживаются «тени» (оболочки) эритроцитов (Трошкина, 2007).

1.1.2 Морфологические особенности клеток гранулоцитарного ряда

Стадии развития гранулоцитов протекают для всех трех типов клеток однотипно: миелобласт – промиелоцит – миелоцит – метамиелоцит – палочко-ядерный гранулоцит – сегментоядерный гранулоцит (Чеснокова, 2012).

Промиелоцит представляет собой крупную, активно делящуюся клетку диаметром 16-24 мкм. Наличие светлого ядра круглой формы, многочисленных полисом, комплекса Гольджи и в значительной степени развитая гранулярная ЭПС обеспечивают образование первичных (азурофильных) гранул. Средний

диаметр гранул сравнительно невелик – от 0,4 до 0,8 мкм. Азурофильные гранулы являются разновидностью лизосом и содержат гидролитические ферменты, а их количество снижается по мере созревания данного типа клеток. К концу развития в промиелоците появляются единичные вторичные – специфические гранулы (Кузнецов, 2016). При окрашивании гематологическими красителями цитоплазма промиелоцита становится голубовато-синего цвета с красно-фиолетовыми гранулами, наслаивающимися на ядро.

Миелоциты всех типов гранулярных лейкоцитов характеризуются несколько меньшим размером относительно предшественника (10-16 мкм). Отличительными морфологическими особенностями данной группы клеток являются небольшая инвагинация эксцентрично расположенного овального ядра и более крупные гранулы гетерохроматина (Луговская, 2011). Цитоплазма клеток имеет голубо-розовое окрашивание и содержит небольшое количество первичных гранул, грЭПС и комплекс Гольджи, активно синтезирующие вторичные гранулы, число которых непрерывно возрастает. Цвет гранул варьирует от красно-коричневого (эозинофильный) до темно-фиолетового (базофильный) в зависимости от типа дифференцирующихся форменных элементов крови (Кузнецов, 2002).

Метамиелоциты более мелкие клетки, отличаются заметной инвагинацией ядра, которое принимает бобовидную форму и уплотняется. В процессе развития гранулоцитарного ростка, ядро изменяет форму до подковообразного, а затем палочковидного. На последующих стадиях дифференцировки формируются перетяжки, разделяющих ядро на сегменты (рис.2). В цитоплазме нейтрофильных гранулоцитов появляются третичные гранулы, а внутри специфических гранул образуются кристаллоиды (эозинофильные гранулоциты) (Андерсон, 2007).

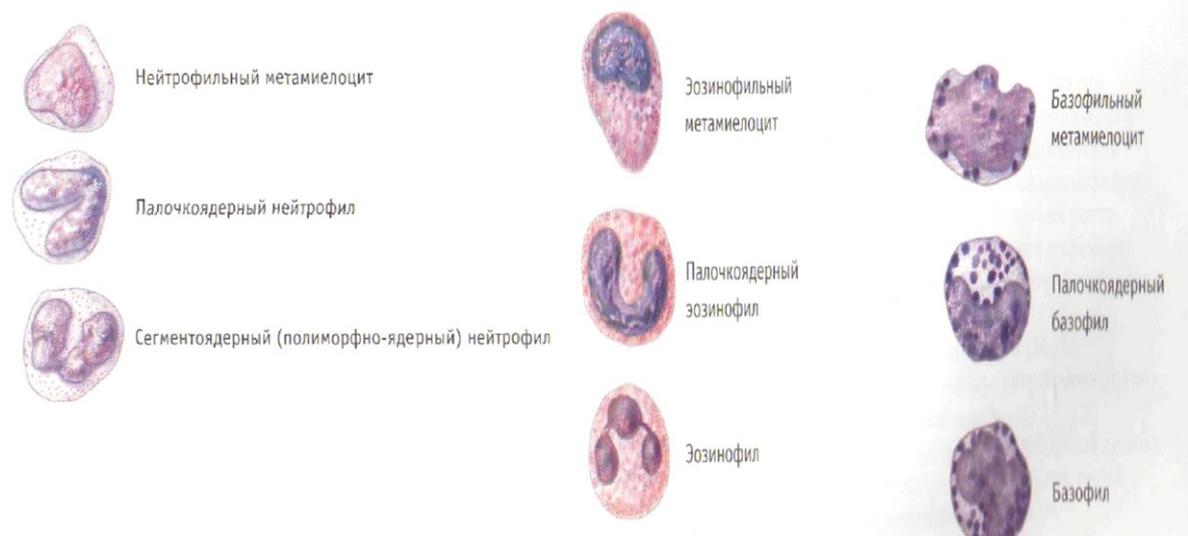


Рис.2. Клетки гранулоцитарного ряда (гранулоцитопоз) (по Ш. Андерсону, 2007).

Нейтрофилы зрелые, или сегментоядерные, нейтрофилы имеют ядро, разделенное на разное количество сегментов в зависимости от степени зрелости. Основную часть составляют клетки, ядро которых трехдольчатое, соединенное узкими нитеподобными перетяжками. У данного типа клеток максимальное содержание гетерохроматина, относительно ранних форм. Средний размер нейтрофила в мазке крови составляет 12 мкм (Волкова, 2013). В нейтрофилах у женщин на одном из сегментов ядра встречается вырост в форме барабанной палочки, так называемое тельце Барра, или половой хроматин. Цитоплазматические гранулы нейтрофилов представлены тремя типами: первичные, вторичные и третичные, и их количество в одной клетке может достигать 200. Кроме того, первичные гранулы являются самыми крупными, что позволяет распознать их на светооптическом уровне (Погорелов, 2016).

Базофилы – размеры клеток на мазках крови составляют от 9 до 12 мкм. Ядро состоит из 2-3 сегментов либо имеет S - образную форму. В нем находится наименьшее количество гетерохроматина, что объясняет более светлую окраску ядра относительно других типов клеток гранулоцитарного ростка. В цитоплазме клеток присутствуют некоторые органеллы, липидные капли, а также азурофильные и специфические гранулы, которые окружены мембраной и заполнены матриксом (Захаров, 2014; Галеева, 2009).

Эозинофилы – размеры клеток на мазках крови колеблются в пределах от 12 до 17 мкм. Форма клеток круглая, иногда имеются выросты, называемые псевдоподиями (Петров, 2012). Ядро эозинофилов, как и у других клеток гранулоцитарного ряда, сегментировано и чаще всего состоит из двух сегментов. У зрелых форм эозинофилов отмечается незначительное количество гетерохроматина. В цитоплазме клеток присутствуют некоторые органеллы, эозинофильные гранулы и гранулы особого типа, специфичные только для данного типа клеток – микрогранулы (Ватутин, 2012).

Морфологические особенности клеток агранулоцитарного ряда. Агранулоциты или незернистые лейкоциты, объединяют в свою группу клетки, в цитоплазме которых присутствуют лишь неспецифические гранулы. Представителями данной группы являются моноциты и лимфоциты, проходящие в процессе своей дифференцировки 2 стадии развития (см. рис. 1.).

Моноциты представлены незрелыми формами *промоноцитами*, которые довольно крупных размеров, диаметром до 18 мкм. Расположенное в центре клетки слегка вогнутое светлое ядро, содержит несколько ядрышек. Постепенно дифференцируясь промоноциты переходят в моноциты (Фёдорова, 2011).

При исследовании клеток под электронным микроскопом, возможно выявить различного рода выпячивания цитоплазмы и крупное подковообразное ядро, реже бобовидное. Цитоплазма моноцитов слабобазофильная, содержит некоторые виды органоидов: небольшие митохондрии, комплекс Гольджи, гр. ЭПС, рибосомы. (Порядина, 2012).

Лимфоциты. Родоначальной клеткой лимфоцитов является лимфобласт. Диаметр лимфобласта до 15 мкм, округлое ядро с 1-2 ядрышками, окружено зоной просветления. *Пролимфоцит* несколько меньшего размера, но с большим количеством цитоплазмы, в которой располагается ядро рыхлой структуры. (Воробьев, 2002). Размеры зрелого лимфоцита в среднем составляют 8 – 9 мкм. Выделяют малые, средние и большие лимфоциты. В мазках крови диаметр малых лимфоцитов 6-7мкм, средних – 8-9мкм, а больших 10-18мкм.

Отличительной особенностью малых лимфоцитов является наличие темного ядра, занимающего до 90% клетки, а у средних – оно более светлое. Боль-

шие лимфоциты характеризуются отчетливо выявляемыми ядрышками и обширной слабобазофильной цитоплазмой с хорошо развитыми органеллами. Так же выделяют большие гранулярные лимфоциты (БГЛ). Они составляют от 5 до 10% всех лимфоцитов крови. Для них характерно ассиметрично расположенное ядро с вдавлениями, на противоположной стороне от которого расположены крупные азурофильные гранулы (Шибинская, 2009). Характерное для всех лимфоцитов перинуклеарное пространство окружает ядро круглой формы. Белым кровяным клеткам крови присущ полиморфизм. По морфологическим признакам все лимфоциты можно разделить на несколько групп:

I) малый лимфоцит – ядерная клетка небольшой величины с весьма узким ободком цитоплазмы;

II) широкоцитоплазменный лимфоцит – относительно крупная по размеру клетка, имеющая широкий ободок цитоплазмы светло-голубого цвета с четким базофильным контуром.

III) лимфоциты с плазматизацией цитоплазмы (Соболева, 2003).

Плазматические клетки развиваются из В-лимфоцитов. Полностью зрелая плазматическая клетка – клетка круглой или овальной формы, с характерной базофильной цитоплазмой и эксцентрическим ядром, которое содержит грубый гетерохроматин (Ribatti, 2017). В цитоплазме наблюдается аппарат Гольджи, и преобладает гранулярный эндоплазматический ретикулум (Travers, 2001). Известны два класса плазматических клеток: короткоживущие и долгоживущие клетки (Pieper, 2013; Сидорова, 2013).

1.1.3 Морфологические особенности клеток тромбоцитопоэза

Процесс созревания тромбоцита проходит в три стадии: мегакариобласт, промегакариоцит, мегакариоцит (см. рис.1.). Количественное соотношение созревающих групп выражается как 1,0:1,2:4,1 соответственно (Бурячковская, 2007).

Отличительной чертой мегакариобласта является крупное ядро диаметром до 10 мкм. Отмечается наличие ядрышек. Базофильная цитоплазма окружает

ядро небольшим пояском и не содержит зернистости (Уфимцева, 2012). Промегакариоцит значительно большего размера относительно мегакариобласта. Цитоплазма занимает большую часть клетки. Ядро имеет неровные очертания и характеризуется более грубой структурой, ядрышек нет (Знаменская, 2007).

Мегакариоциты – гигантские клетки костного мозга, с выраженной цитоплазмой и полиморфным ядром. Выделяют незернистые, зернистые и обильнозернистые мегакариоциты (Ключников, 2015). Более ранним стадиям созревания соответствует гладкая, лишенная выростов цитоплазматическая мембрана. Далее происходит появление волосков и различного размера удлинённых выростов, что вероятнее всего связано с начальной стадией образования протромбоцитов. Протромбоциты – незрелые формы тромбоцитов, которые были образованы из единичных мегакариоцитов, циркулирующих в кровотоке (Бурячковская, 2007).

Тромбоциты являются безъядерными образованиями диаметром 2-5 мкм и толщиной 0,5-0,75 мкм, ограниченными снаружи клеточной мембраной. Зрелые тромбоциты имеют форму двояковыпуклого диска. Условно, клетку кровяных пластинок можно разделить на 2 части, наружную более светлую, и внутреннюю, заполненную гранулами (Пантелеев, 2014).

Разнообразие циркулирующих в периферической крови тромбоцитов определяется скоростью продукции, оборота, активации и удаления этих клеток. Среди них принято выделять пять морфологических групп: юные с диаметром 5-5,5 мкм (3,2%), зрелые – 1,5-3 мкм (87%), старые – 0,5-1,5 мкм (4,5%), макроформы – >5 мкм (2,8%) и формы раздражения (2,5%) (Козинец, 2006).

1.2. Морфологические особенности клеток крови при развитии лейкозов

Лейкозы – представляют собой группу злокачественных заболеваний, при которых аномальная пролиферация гемопоэтических клеток поражает костный мозг и лимфоидную ткань, после чего, способна распространяться в другие органы и системы (Смирнова, 2013). Классификация всех лейкозов на острые и

хронические виды, объясняется преобладанием в периферической крови тех или иных клеточных форм, обладающих морфологическими особенностями (Дроздов, 2008).

1.2.1. Острые лейкозы

Группу острых лейкозов определяет общий признак – субстрат опухоли представлен бластными клетками, а при хроническом лейкозе, в крови преобладают созревающие и зрелые элементы, которые не способны к полноценной функциональной активности. Название форм каждого вида лейкоза, зависит от названий предшественников опухолевых клеток. Однако, существуют случаи острого лейкоза, когда клетки не имеют признаков принадлежности к какому-либо ростку кроветворения, тогда речь идет о недифференцируемом остром лейкозе (Зуховицкая, 2015).

В соответствии с рекомендациями ВОЗ, основным критерием при диагностике острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) является обнаружение бластных форм в костном мозге (КМ) более 25 %. При острых лейкозах в первую очередь проявляется поражение лимфатических узлов, с их значительным увеличением размера. Гистологическое исследование подобных поражений показывает диффузное разрастание клеток и светлые уродливые полиморфные ядра (Погорелов, 2008).

Первый период болезни характеризуется значительным угнетением кроветворной системы и высоким бластозом костного мозга. В научной литературе имеются работы (Гиндина, 2017; Ковынев, 2017), указывающие на то, что морфологическая картина периферической крови (ПК) при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) сопровождается умеренной анемией (гипер- или нормохромная), снижением количества тромбоцитов, лейкоцитозом или нейтропенией (на 38%; Клочкова, 2016), присутствием лимфобластов (более 30%), возможно наличие атипических лимфоцитов. Микроскопирование клеток крови больных ОЛЛ доказывает присутствие различной формы ядер бластов, окрашенных как гипо- так и гиперхромно.

Однако следует отметить, что по данным анализа периферической крови в 6 % случаев ОЛЛ в детском возрасте, характеризуются исключительно лимфо-

цитозом. Около 85% всех ОЛЛ представлены незрелыми пре-В-формами лимфоцитов. Хотя опухолевые В- и Т-лимфобласты морфологически неразличимы, их классифицируют на основе иммунофенотипирования (Мухтаров, 2016).

Морфология и клиническая картина острого миелобластного (ОМЛ) и миеломонобластного лейкозов (ОММЛ) идентична: наблюдаются признаки эозинофилии, а присутствующие бластные клетки в своей цитоплазме содержат азурофильные гранулы, нередко переходящие в трубчатые структуры – палочки Ауэра (Рис.3.). В случае если количество бластных форм, в которых обнаруживается зернистость составляет 30 - 40 % речь идет о промиелоцитарном лейкозе, при миелобластном – их количество не превышает 20 % (Назаренко, 2005).

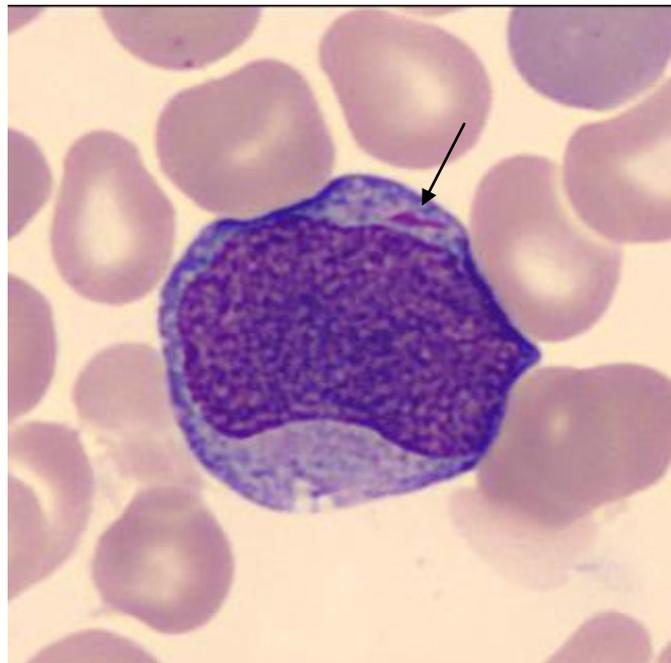


Рис.3. Палочка Ауэра в миелобласте, ув. $\times 1000$ (Луговская, 2011).

В процессе развития болезни бластные клетки изменяют форму, вследствие чего, внутренние структуры так же приобретают иные очертания: ядро неправильной формы, широкий ободок цитоплазмы (Баранова, 2012).

При исследовании крови больного ОМЛ наблюдается ярко выраженная анемия, а в 1-2 % случаев – тромбоцитоз. В то же время, для больных острым промиелоцитарным лейкозом характерна глубокая тромбоцитопения. Нередко в крови больных данной группы определяется феномен «провала»: отсутствие

промежуточных форм между бластными клетками и зрелыми нейтрофильными гранулоцитами (Коленкова, 2002).

Достоверно доказано, что по сравнению со здоровыми людьми, общее число лейкоцитов у больных ОМЛ было снижено на 61,5%. Так же, наблюдается увеличение числа моноцитов и базофилов на 41,5% и 74,7% соответственно (Клочкова и др., 2016). По данным научных источников острый миелобластный лейкоз сопровождается полным отсутствием зрелых нейтрофилов (Савченко, 2014).

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПМЛ) характеризуется особой морфологией бластных форм. Цитоплазма бластов окрашивается в голубой цвет и имеет многочисленные выросты. Обильное количество гранул разных размеров, окрашиваются гематологическими красителями от розового до темно-фиолетовых цветов. Вследствие этого различают два вида промиелоцитарного лейкоза: микрогранулярный и макрогранулярный (Ходулева, 2010).

Острый мегакариобластный лейкоз сопровождается умеренная анемия и глубокая тромбоцитопения. Опухолевые клетки костного мозга имеют круглое ядро и 1-2 небольших четко выраженных эозинофильных ядрышка. Так же встречаются двуядерные формы. Обильная светлая отросчатая цитоплазма клеток имеет признаки вакуализации (Никитин, 2012).

Острый эритромиелоз составляет порядка 5% от общего количества острых нелимфобластных лейкозов. Протекание болезни характеризуется значительным увеличением числа эритроцитов, сопровождающееся тромбоцитопенией и лейкопенией. Наблюдаемые в крови опухолевые клетки, способны к дальнейшей дифференцировке, вплоть до стадии зрелых эритроцитов (Баранова, 2012).

1.2.2. Хронические лейкозы

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) – опухоль, состоящая из морфологически однотипных малых В-лимфоцитов круглой формы, которые вместе с параиммунобластами присутствуют в периферической крови, костном

мозге и лимфатических узлах. Согласно данным литературы у 15% обследуемых были выявлены атипичные морфологические признаки, а именно: в крови содержалось свыше 10% пролимфоцитов, более 15% лимфоплазматических и расщепленных клеток (Свирновский, 2013).

Ранние опухолевые клетки ХЛЛ, в отличие от острых лейкозов, способны к дальнейшему развитию и дифференцировке до зрелых клеток. Относительно картины крови – для хронического лимфоцитарного лейкоза присущ абсолютный лимфоцитоз. Белые клетки крови могут быть как атипичными, так и без особых морфологических особенностей. Встречаются артефакты, называемые тени Боткина-Гумпрехта (Рукавицын, 2004).

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) это опухоль, возникающая из предшественниц миелопоэза, дифференцирующихся до зрелых форм (Кобетс, 2000). Число клеток гранулоцитарного ростка гемопоэза, находящихся на различных стадиях дифференцировки, у больных ХМЛ в значительной степени превышено как в периферической крови, так и в костном мозге. Характерной особенностью данного вида лейкоза является «эозинофильно-базофильная ассоциация» – высокое процентное содержание эозинофилов и базофилов в лейкоцитарной формуле. Данное явление приводит к анемии и тромбоцитопении, т.к. угнетает процессы созревания клеток остальных миелоидных линий. Клетки красной крови соответствуют норме, однако могут встречаться эритрокарициты (Абдулкадыров, 2016).

Волосатоклеточный лейкоз – один из видов хронического лейкоза, сопровождается анемией, лейкопенией и тромбоцитопенией. В периферической крови встречаются клетки с ворсистой цитоплазмой, именуемые – «волосатыми клетками» (рис.4.).

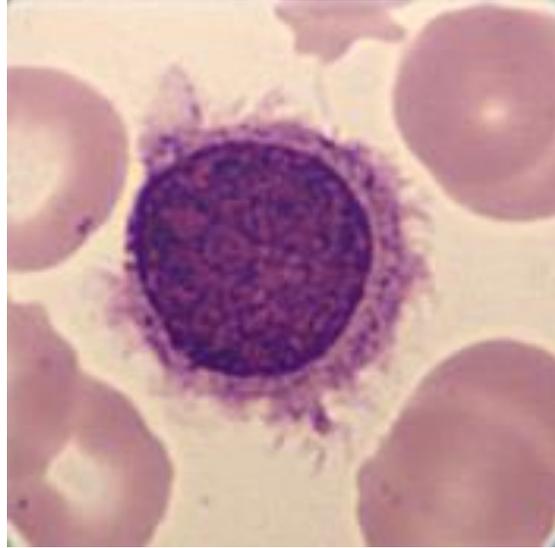


Рис.4. Волосатые клетки при хроническом волосатоклеточном лейкозе, ув. $\times 1000$ (Андерсон,2007).

Размер данных клеток в два раза превышает нормальные лимфоциты. Присутствующее ядро может иметь круглую, овальную форму или быть почкообразным с глыбчатым хроматином (Зуховицкая, 2013).

Хронический моноцитарный лейкоз (ХММЛ) сопровождается существенным увеличением количества моноцитарных клеток в ПК (26,0%) и костном мозге (Косанова, 2015). Следует отметить, что костномозговое кроветворение при данном заболевании длительное время остается в норме, количественный состав форменных элементов крови не нарушен. Содержание бластных клеток в крови менее 5%. Отмечается повышенное число мегакариоцитов у 64,7% больных (Косанова, 2015).

1.2.3. Лимфома

Лимфомы, это заболевания, при которых происходит неопластическая трансформация клеток, находящихся преимущественно в лимфоидной ткани. Злокачественные лимфомы подразделяют на болезнь Ходжкина (БХ, лимфогранулематоз, лимфома Ходжкина) и неходжкинские лимфомы. Так, в литературе имеются данные о том, что все лимфомы относящиеся к Болезни Ходжкина характеризуются такими изменениями показателей системы крови как, сдвиг лейкоцитарной формулы влево, лимфопения, увеличение СОЭ, нормохромная

анемия средней степени тяжести, в редких случаях тромбоцитоз (Клименко, 2007).

При заболевании Т-клеточным лимфобластным лейкозом/лимфомой (Т-ОЛЛ) в крови наблюдаются бластные клетки средних и мелких размеров. В их ядре присутствуют 1-2 нуклеолы, хроматин нежно-сетчатый. Базофильная цитоплазма не имеет признаков азурофильной зернистости (Фиясь, 2013)

Одним из распространенных вариантов среди Т-клеточных лимфом является периферическая неспецифицированная Т-клеточная лимфома (ПНТКЛ), которая отличается явно выраженной эозинофилией в крови (Крячок, 2014).

Ангиоиммуобластная Т-клеточная лимфома (АТКЛ) характеризуется патологическими формами Т-клеток среднего размера, а также присутствием крупных В-бластных форм, часто инфицированных вирусом Эпштейна-Барра (Тумян, 2009).

У 50 % обследованных с диагнозом лимфома из В-клеток маргинальной зоны селезенки (ЛКМЗС) в периферической крови наблюдалась умеренная анемия, тромбоцитопения и лейкоцитоз, редко превышающий $25 \times 10^9/\text{л}$. Встречающиеся лимфоциты, как среднего, так и большого размера (8-12 мкм). Их ядро округлой формы, иногда с вмятинами, либо расщепленное (Хвастунова, 2017).

Цитоплазма этих клеток голубого цвета с перинуклеарным просветлением, может наблюдаться вакуолизация. На одном из полюсов клетки встречаются тонкие короткие цитоплазматические выросты. Иногда выпячивания цитоплазмы более широкие и располагаются на противоположных клеточных полюсах. (Julhakyun, 2011).

1.3. Классификация лейкозов

За последнее пятидесятилетие в научной литературе было предложено немало классификаций злокачественных образований кроветворной ткани. Одни из них имеют огромное значение для современной клинической практики, другие оказались невостребованными (Волкова, 2001; Абдулкадыров, 2004). Тем не менее, фундаментальное значение всегда придавалось различию лимфом и лейкозов, вследствие чего для них разрабатывались отдельные классифика-

ции. Практически все классификации для лимфом подразделялись на две основные категории: основанные на морфологических характеристиках клеток, либо на оценке характера роста опухоли в ткани (Percy, 1990).

Приобретенные навыки к распознаванию морфологических отличий бластных клеток, лимфоцитов и клеток миелоидного ростка, дали возможность дифференцировать лейкозы с подразделением их на острые и хронические формы. При остром лейкозе поражение костного мозга происходит преимущественно незрелыми - бластными клетками крови, а хронический – характеризуют клетки способные к дифференцировке до зрелых, но функционально неполноценных лимфоцитов (Воробьев, 2002).

В 1955 Раппопорт впервые опубликовал данный подход относительно классификации, что стало важным прорывом в изучении онкологии крови. Однако, появившаяся классификация Люкса – Коллинза (1973) была основана на том, что клетки лимфомы подверглись блокировке на стадии созревания, а значит опухоли можно классифицировать аналогично нормальным стадиям дифференцировки лимфоцитов (Глузман, 2016).

Национальный институт рака США (NCI) предпринял попытку сформулировать все имеющиеся данные в сравнительных целях, что, по сути, и стало первой классификацией, основанной, по большому счету на морфологических характеристиках опухоли. В отличие от Кильской классификации (1974), которая утверждала, что размер клеток опухоли напрямую влияет на степень заболевания, формулировка NCI отражала иные данные, опираясь на клиническую практику. Так, высокая степень означала быстрорастущую опухоль, которую возможно излечить методами химиотерапии, а низкая степень – медленнее растущие, но чаще неизлечимые лимфомы (Фритц, 2017).

Франко-американо-британская (FAB) система предоставила совершенно иную классификацию лимфоидных и миелоидных лейкозов и миелодисплазий (табл. 1.1-1.2), основанную на традиционном исследовании окрашенных препаратов (Баранов, 2009; Вильчевская, 2014).

FAB- классификация острых нелимфобластных лейкозов (Баранов, 2009)

Вариант ОНЛЛ	Морфологические критерии (по данным миелограммы)	Цитохимическая характеристика		
		МПО, Суд. В	ХАЭ	НЭ
МО – острый миелобластный лейкоз с минимальной дифференцировкой	≥ 30% миелобластов без гранул. Палочки Ауэра(-)	-	-	-
М1 – острый миелобластный лейкоз без созревания	≥ 30% миелобластов, с отсутствием или скудными гранулами. Палочки Ауэра(±)	+	±	-
М2 – острый миелобластный лейкоз с созреванием	≥ 30% миелобластов с гранулами; ≥ 10% промиелоцитов или созревающих гранулоцитарных клеток; < 20 % моноцитов. Палочки Ауэра (+)	++	+	-
М3 – острый промиелоцитарный лейкоз	≥ 30% миелобластов и промиелоцитов; < 10 % созревающих гранулоцитарных клеток. Палочки Ауэра (++)	+++	+++	-
М4 – острый миеломоноцитарный лейкоз	≥ 30% миелобластов, монобластов и промиелоцитов; >20 % моноцитарных клеток. Палочки Ауэра (±)	++	++	++
М5а – острый монобластный лейкоз без дифференцировки	>80 % крупных монобластов с выраженной цитоплазмой. Палочки Ауэра (-)	±	-	+++
М5b – острый монобластный лейкоз с дифференцировкой	>80 % моноцитарных клеток с преобладанием промоноцитов и моноцитов. Палочки Ауэра (±)	±	-	+++
М6 – острая эритролейкемия	Миелобласты >30 % . Эритроидные предшественники с мегалобластами >50 %. Палочки Ауэра (+)	-	-	-
М7 – острый мегакариобластный лейкоз	Бласты с «лимфоидной» морфологией и отшнуровкой цитоплазм, мегакариобласты >30 %, диспластические мегакариоциты. Палочки Ауэра (-).	-	-	-

Примечание: МПО – миелопероксидаза; Суд. В – судан черный; ХАЭ – хлорацетатэстераза; НЭ – неспецифическая эстераза.

FAB- классификация острых лимфобластных лейкозов (Вильчевская, 2014)

Цитологические особенности	L 1	L 2	L 3
Размер клетки	Преобладают малые клетки	Большие, переменные по размеру	большие
Ядерный хроматин	Гомогенный во всех клетках	Вариабельный, гетерогенный	Тонкопетлистый и гомогенный
Форма ядра	Правильная: иногда ядро расщепленное или вдавленное	Неправильная, как правило, ядро расщепленное или вдавленное	Овальная или правильная
Нуклеолы	Не видны или малы и непостоянны	Часто большие, одна и более	Глубокие, пузырьковидные, одна или более
Количество цитоплазмы	Скудное	Вариабельное	Умеренно обильное
Базофилия цитоплазмы	Слабая или умеренная, редко интенсивная	Вариабельная, густая в некоторых случаях	Очень густая
Вакуолизация цитоплазмы	Вариабельная	Вариабельная	Часто выраженная

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) публикует классификацию опухолей кроветворной ткани (Spackman, 2000). Основу новой классификации составили следующие положения:

- 1) все виды опухолей подразделялись по принадлежности к определенному отделу кроветворения: миелопоэзу – миелоидные новообразования, и лимфопоэзу – лимфомы;
- 2) производилось установление уровня зрелости клеток, на основании имеющихся данных, о процессах их дифференцировки;
- 3) в приоритете стояло выявление генетических нарушений т.к. считалось, то они являются основой патогенеза заболевания.

В 2001 и 2008 гг. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в сотрудничестве с Европейской ассоциацией гематопатологов и Обществом гематопатологов США были представлены 3-е и 4-е издания монографии «Классификация ВОЗ опухолей кроветворной и лимфоидной тканей» (Swerdlow, 2008). В 2016 г. был осуществлен пересмотр классификации миелоидных ново-

образований (МН) и острых лейкозов (ОЛ). Основные подтипы МН и ОЛ модернизированной классификации представлены в табл. 1.3.

Таблица 1.3

Классификация ВОЗ миелоидных новообразований и острых лейкозов (Глузман, 2016)

Тип пролиферации	Обозначения
<p>Миелопролиферативные новообразования Хронический миелолейкоз (ХМЛ), BCR-ABL1+ Хронический нейтрофильный лейкоз (ХНЛ) Истинная полицитемия Первичный миелофиброз (ПМФ) ПМФ, префиброзная/ранняя стадия ПМФ, явная фиброзная стадия Эссенциальная тромбоцитемия Хронический эозинофильный лейкоз, неуточненный МПН неклассифицируемые Мастоцитоз</p>	МПН
<p>Миелоидные/лимфоидные новообразования с эозинофилией и перестройкой генов PDGFRA, PDGFRB или FGFR1 либо с PCM1-JAK2 Миелоидные/лимфоидные новообразования с перестройкой PDGFRA Миелоидные/лимфоидные новообразования с перестройкой PDGFRB Миелоидные/лимфоидные новообразования с перестройкой FGFR1 Предварительная форма: Миелоидные/лимфоидные новообразования с PCM1-JAK2</p>	-
<p>Миелодиспластические синдромы/миелопролиферативные новообразования Хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ) Атипичский хронический миелолейкоз (аХМЛ, BCR-ABL1-) Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (ЮММЛ) МДС/МПН с кольцевыми сидеробластами и тромбоцитозом (МСД/МПН-КС-Т) МДС/МПН неклассифицированные</p>	(МДС/МПН)
<p>Миелодиспластические синдромы МДС с однолинейной дисплазией МДС с кольцевыми сидеробластами (МДС-КС) МДС-КС и однолинейная дисплазия МДС-КС и мультилинейная дисплазия МДС с мультилинейной дисплазией МДС с избытком бластов МДС с изолированной del(5q) МДС неклассифицированный <i>Предварительная форма: Рефрактерная цитопения детского возраста</i> <i>Миелоидные новообразования с наследственной генетической предрасположенностью</i></p>	(МДС)
<p>Острые миелоидные лейкозы и родственные новообразования ОМЛ с повторяющимися генетическими аномалиями ОМЛ с t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 ОМЛ с inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 ОМЛ (промиелоцитарный) с PML-RARA ОМЛ с t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A ОМЛ с t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214</p>	(ОМЛ)

<p>ОМЛ с inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM ОМЛ (мегакариобластный) с t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 Предварительная форма: ОМЛ с BCR-ABL1 ОМЛ с мутированным NPM1 ОМЛ с биаллельными мутациями СЕВРА <i>Предварительная форма: ОМЛ с мутированным RUNX1</i> ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией Миелоидные новообразования, связанные с терапией ОМЛ, неуточненные ОМЛ с минимальными признаками дифференцировки ОМЛ без признаков созревания ОМЛ с признаками созревания Острый миеломоноцитарный лейкоз Острый монобластный/моноцитарный лейкоз Чистый (истинный) эритроидный лейкоз Острый мегакариобластный лейкоз Острый базофильный лейкоз Острый панмиелоз с миелофиброзом</p>	
<p>Миелоидная саркома; Миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна Преходящий аномальный миелопоэз Миелоидный лейкоз, ассоциированный с синдромом Дауна</p>	(МС)
<p>Новообразование из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток</p>	
<p>Острые лейкозы неопределенного линейного происхождения Острый недифференцированный лейкоз ОЛ со смешанным фенотипом (ОЛСФ) с t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1+ ОЛСФ с t(v;11q23.3); с перестройкой KMT2A ОЛСФ В/миелоидный неуточненный ОЛСФ Т/миелоидный неуточненный</p>	(ОЛ)
<p>В-клеточные лимфобластные лейкозы/лимфома В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома неуточненный В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с повторяющимися генетическими аномалиями В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с t(v;11q23.3); с перестройкой KMT2A В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1</p>	(В-ЛЛ)
<p>В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с гипердиплоидностью В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с гиподиплоидностью В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с t(5;14)(q31.1;q32.3); IL3-IGH В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1 Предварительная форма: В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома BCR-ABL1-подобный Предварительная форма: В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с AMP21 Т-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома Предварительная форма: Лимфобластный лейкоз из ранних Т-клеток-предшественников Предварительная форма: Лимфобластный лейкоз/лимфома из ЕК-клеток</p>	(Т-ЛЛ)

Классификация не претерпела существенных изменений по сравнению с четвертым изданием 2008 г. Однако открытие новых мутаций и улучшенное понимание морфологических признаков, несомненно, повлияли на совершенствование диагностических критериев при отдельных нозологических формах патологического процесса (Глузман, 2016).

1.4. Использование методов компьютерной морфометрии в гематологии

Разработанные методы дифференциальной окраски клеток (Эрлих, 1868 г) способствовали скачку знаний о морфологических особенностях элементов системы крови. Известные на тот момент методы окраски Романовского были усовершенствованы Паппенгеймом (1898 г), что позволило описать переходные формы клеток костного мозга. Данные морфологические описания остаются актуальными и сейчас.

Внедрение прижизненного пункционного исследования костного мозга, позволило диагностировать лейкоз, основываясь на морфологических исследованиях мазка клеток костного мозга. Подобные методики базируются на изучении каждого объекта непосредственно исследователем, что является очень трудоемким процессом. Данные, полученные в ходе исследования, являются очень субъективными. Развитие технологий позволило автоматизировать методы морфометрии, в результате чего появились программно-аппаратные комплексы (Мыщик, 2011).

Проблемы, стоящие перед современной гематологией, требуют углубленных знаний о принципах и закономерностях работы кроветворной системы, которые во многом определяются сведениями о структурной, функциональной и биохимической организации его клеточных элементов. Расширению и углублению этих знаний может способствовать количественная оценка морфологических характеристик, как в норме, так и в условиях патологии, что даст возможность количественно оценить морфологические параметры патологических изменений.

Одним из актуальных методов, позволяющим получить необходимые знания в области морфологии клеток, является метод компьютерной морфометрии. Морфометрические исследования гемоизображений немало распространены в практике лабораторного анализа. С помощью программ, возможно оценивать форму объектов, вычислять ее округлость, полноту (выпуклость и вогнутость ее контура), вытянутость, избирательно подсчитывать число клеток, измерять расстояние, а также определять их площадь (Кларк, 2007).

Методы компьютерной морфометрии не только ускоряют и облегчают работу человека, но и открывают новые возможности в выявлении морфохимических показателей исследуемых объектов. Компьютерная морфометрия позволяет получить математические характеристики клеточной популяции, а также дает возможность судить об активности внутриклеточных процессов (Давыдкин, 2010).

При помощи цифровой камеры, установленной на микроскоп, получают изображение, которое в дальнейшем исследуют. На первом этапе анализа препарата при компьютерной морфометрии проводят преобразование светооптического изображения в цифровую форму. Для этого используют методы обработки микроскопических изображений – выделение части изображения, увеличение масштаба, цветовая коррекция. Второй шаг состоит в выделении нужных областей изображения, основываясь на определенных характеристиках. Эта процедура называется сегментацией изображения и может происходить в автоматическом или ручном режиме. После чего измеряют один или несколько параметров объекта и статистически анализируют, полученные результаты (Худоерков, 2014).

В научной литературе имеются работы, указывающие на востребованность данного метода. С помощью использования морфометрических программ были проведены исследования бластных клеток костного мозга больных острым миелоидным лейкозом (Погорелов, 2006), изучена морфологическая картина лимфоцитов периферической крови при апластической анемии (Шишина, 2009). В работе Детиненко (2006) морфометрия использовалась при изучении морфологии иммунокомпетентных клеток периферической крови. Виноград-

ская и др. (2002), проводя витальную компьютерную фазовую морфометрию клеток периферической крови, в своей работе доказали, что морфометрические показатели (диаметр, периметр, площадь и объём) отражают морфологические особенности и функциональную полноценность клеток. Давыдкин в работе «Компьютерная морфометрия лимфоцитов периферической крови у больных пневмонией различного возраста» (2010) предпринял попытку изучить морфологические особенности клеток периферической крови у больных в активной фазе пневмонии.

Таким образом, современные компьютеризованные цитологические методы, применяемые в области клеточной физиологии, дают возможность изучать морфологию клеток с более высокой точностью и воспроизводимостью.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Организация эксперимента и забор материала

Экспериментальные исследования выполнены на базе кафедры биологии НИУ «БелГУ» в лаборатории «Физиологии адаптационных процессов». Объект исследования – венозная кровь больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ; n=42), острым миелобластным лейкозом (ОМЛ; n=21), хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ; n=10), хроническим миелобластным лейкозом (ХМЛ; n=6) и лимфомой (n=8), которые находились на лечении в областной клинической больнице Святителя Иоасафа г. Белгорода. В качестве контроля использовали человеческую кровь 10 здоровых доноров в возрасте от 25 до 45 лет.

Периферическую кровь пациентов получали путем венепункции при участии медицинского персонала гематологического отделения. Забор крови осуществляли в вакуумные пробирки Vacutte КЗЕ.

2.2. Гематологические исследования

Подсчет числа эритроцитов в крови проводили с использованием камеры Горяева, согласно унифицированному методу. В пробирку с 4 мл физиологического раствора добавляли 0,02 мл крови (разведение 1:200), аккуратно перемешивали, не взбалтывая, избегая по возможности механического гемолиза эритроцитов. Заполняли камеру Горяева взвесью эритроцитов и подсчитывали число в камере Горяева по общепринятой методике с использованием светового микроскопа Olympus при ув. 40. Число эритроцитов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 4000 \cdot v}{b}, \quad (1)$$

где а – число эритроцитов, сосчитанных в 5 квадратах.

б – количество сосчитанных малых квадратов.

в – разведение крови.

Подсчет числа лейкоцитов осуществляли согласно общепринятому методу. Кровь насасывали в смеситель меланжера до метки 0,5, затем опускали ме-

ланжер в склянку с 3%-ным раствором уксусной кислоты и, держа его под углом, заполняли раствором до метки 11 (разбавление в 20 раз). Встряхивали в течение 5-10 сек и укладывали горизонтально. Заполняли камеру Горяева взвесью клеток. Подсчет лейкоцитов проводили в 50 больших квадратах на световом микроскопе Olympus ув. 40. Вычисление результатов анализа осуществляли по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 4000 \cdot v}{b} \quad (2)$$

где: X – число форменных элементов в 1 мм³ крови;

a – число форменных элементов в определенном количестве квадратов;

b – число сосчитанных квадратов;

v – степень разведения крови.

Концентрацию гемоглобина в крови измеряли гемиглобинцианидным методом. Принцип метода: гемоглобин крови при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в гемиглобин, образующий с ацетонциангидрином гемиглобинцианид (цианметгемоглобин). Поглощение гемиглобинцианида при длине волны 530-550 нм пропорционально концентрации гемоглобина в крови.

Трансформирующий реактив (один флакон) и ампулу ацетонциангидрина количественно переносили в мерную колбу и доводили до 1 л дистиллированной водой. Получали прозрачный раствор желтого цвета, который стабилен при хранении в посуде из темного стекла при комнатной температуре в течение нескольких месяцев.

К 5 мл трансформирующего раствора добавляли 0,02 мл крови (разведение в 251 раз), хорошо перемешивали, через 10 мин измеряли экстинцию на фотометре фотоэлектрическом КФК-3-01 при длине волны 530-550 нм (540 нм, зелёный светофильтр в кювете с толщиной слоя 10 мм против холостой пробы – трансформирующего раствора). Измеряли при тех же условиях пробу с калибровочным раствором.

Расчёт содержания гемоглобина в крови осуществляли по формуле:

$$C = \frac{E_n}{E_k} \cdot K \quad (3)$$

где: С – содержание гемоглобина в пробе, г/л;

E_n – экстинция измеряемой пробы;

E_k – экстинция пробы с калибровочным раствором;

К – концентрация гемоглобина в калибровочном растворе, г/л.

2.3. Приготовление и окраска мазков крови

Для исследования готовили мазки крови общеизвестным способом (Абдулкадыров, 2004; Козинец, 2008). На хорошо обезжиренное, очищенное, с ровной, гладкой поверхностью предметное стекло наносили каплю крови. Узкое шлифованное стекло, наклоненное под углом 45° , приводили в соприкосновение с каплей крови так, чтобы она распределилась узкой полосой по образовавшемуся углу. Затем, медленно отодвигая шлифованное стекло к противоположному концу предметного, формировали образование ровного тонкого слоя крови.

Мазки крови фиксировали метиловым спиртом (75%) в течение 5 минут и высушивали на воздухе. После чего окрашивали по Романовскому-Гимзе (Козинец, 1998). Для этого предметные стекла с мазками помещали на мостик, расположенный в кювете и заливали разведенным красителем на 20 мин.

На полученных мазках осуществляли подсчет лейкоформулы в количестве 200 белых кровяных телец с каждого мазка. Подсчет отдельных форм лейкоцитов осуществляли по четырехпольному методу, пользуясь линией меандра на световом микроскопе Axiostar Plus (Carl Zeiss, Германия) с использованием иммерсионного объектива, ув. X100. В четырех участках мазка, вблизи каждого из его углов, подсчитывали по 50 лейкоцитов, передвигая препарат с помощью крестообразного столика от края мазка вглубь на 3-4 поля зрения, а затем на такое же число полей в сторону и снова по направлению к краю мазка. Мазок передвигали по ломаной линии в виде буквы «П». Для подсчета использовали гематологические счетчики для подсчета лейкоформулы в ручном режиме. По ре-

зультатам подсчета, выводили процентное соотношение отдельных видов лейкоцитов.

2.4. Компьютерная морфометрия мазков крови

Морфометрические исследования проводили с помощью комплекса аппаратно-программной визуализации морфологических препаратов, анализа и регистрации оптических и морфологических показателей «ВидеоТестТ» (Санкт-Петербург, регистрационное удостоверение № 29/20010702/6102-04 от 16.02.2004 г). Видеозахват изображений с мазка осуществляли с помощью видеокамеры. На полученных изображениях клеток измеряли средний габарит (мкм) 1000 эритроцитов с мазка. По результатам измерений формировали таблицу классов, согласно которой подразделяли измеренные эритроциты на микроциты – от 4,0 до 6,5 мкм, нормоциты – от 6,6 до 8,4 мкм и макроциты – 8,5-10,1 мкм. По результатам измерений строили кривые Прайс-Джонса, которые характеризуют распределение эритроцитов по диаметру.

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием t критерия Стьюдента $p < 0,05$ в случае нормального распределения признака и U-критерия Манна-Уитни при $p < 0,05$ – для непараметрических данных.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Морфофизиологическая характеристика эритроидной популяции при развитии пролиферативных процессов в системе крови

Гематологические параметры системы крови исследуемых групп больных представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1

Гематологические показатели системы крови

Группа	Число эритроцитов, $10^{12} * \text{л}^{-1}$	Концентрация гемоглобина, г/л
Контроль (доноры)	$3,72 \pm 0,07$	$125,74 \pm 3,2$
ОЛЛ	$3,36 \pm 0,31^*$	$102,4 \pm 1,3^*$
ОМЛ	$3,81 \pm 0,4$	$115,2 \pm 1,6^*$
ХЛЛ	$3,9 \pm 0,5^*$	$126,8 \pm 5,2$
ХМЛ	$4,2 \pm 0,6^*$	$135,1 \pm 3,2^*$
Лимфома	$2,0 \pm 0,3^*$	$80,4 \pm 2,8^*$

Примечание: * - статистически достоверные различия между значениями эритроцитов доноров и больных лейкозом, лимфомой по критерию Манна-Уитни при $p < 0,05$.

В группе пациентов больных ОЛЛ установлено снижение числа эритроцитов и концентрации гемоглобина соответственно на 10,7% и 22,8% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. У больных с диагнозом ОМЛ выявлено снижение концентрации гемоглобина на 9% ($p < 0,05$) при этом число эритроцитов достоверно не отличалось от цифр контроля.

При исследовании параметров крови в группе больных с диагнозом ХЛЛ установлено увеличение числа эритроцитов на 4,6% ($p < 0,05$) при этом концентрация гемоглобина была в пределах недостоверных различий с контролем. У пациентов с диагнозом ХМЛ число эритроцитов и концентрация гемоглобина увеличились соответственно на 11% и 7% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. У больных с диагнозом лимфома число эритроцитов и гемоглобин были снижены соответственно на 86% и 56% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

В результате проведенных исследований установлены отличия в диаметре эритроцитов между группами здоровых людей и больных лейкозом, лимфомой (табл. 3.2).

Таблица 3.2

**Диаметр эритроцитов (мкм) в условиях злокачественной
пролиферации в системе крови**

Пробы	Макроциты	Нормоциты	Микроциты
Контроль (доноры)	8,91 ± 0,32	7,00 ± 0,37	6,42 ± 0,32
ОЛЛ	8,81 ± 0,31*	7,53 ± 0,43*	6,37 ± 0,39
ОМЛ	8,79 ± 0,32	7,23 ± 0,44*	6,20 ± 0,34*
ХЛЛ	8,85 ± 0,31*	7,40 ± 0,38*	6,38 ± 0,39
ХМЛ	8,82 ± 0,34*	7,29 ± 0,5*	6,14 ± 0,27*
Лимфома	8,79 ± 0,29	7,05 ± 0,39	6,07 ± 0,29*

Примечание: * - статистически достоверные различия между значениями эритроцитов доноров и больных лейкозом, лимфомой по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Согласно данным таблицы 3.2 в группе больных ОЛЛ диаметр макроцитов снижен на 1,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Значения средних диаметров макроцитов больных ОМЛ и лимфомой достоверно не отличаются от таковых в контроле. В группе больных ХЛЛ и ХМЛ диаметр макроцитов был снижен соответственно на 0,7 % ($p < 0,05$) и 1,0 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

В субпопуляции нормоцитов наблюдали увеличение диаметра клеток во всех исследуемых группах. Так, в группе больных ОЛЛ диаметр нормоцитов увеличился 7,5 % ($p < 0,05$), у больных ОМЛ – на 3,2% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В группе больных ХЛЛ диаметр нормоцитов увеличен на 5,7% ($p < 0,05$), а у пациентов с диагнозом ХМЛ – на 4,1% ($p < 0,05$) по сравнению с донорами. В группе больных лимфомой наблюдали недостоверное увеличение диаметра нормоцитов по сравнению с контролем.

Значение среднего диаметра микроцитов у всех изученных групп было снижено по сравнению с контролем. В группе больных острыми лейкозами существенное снижение диаметра микроцитов наблюдали у пациентов с диагно-

зом ОМЛ (на 3,4%; $p < 0,05$), при этом у больных с ОЛЛ существенных различий по сравнению с контролем не установлено. В группе больных хроническими лейкозами выявлено снижение диаметра микроцитов у больных с диагнозом ХМЛ на 4,4% ($p < 0,05$), однако у пациентов с ХЛЛ существенных различий, по сравнению с контролем, не установлено. У пациентов с диагнозом лимфома диаметр микроцитов снижен на 5,5% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Используя величины диаметров эритроцитов экспериментальных и контрольной групп, были построены эритроцитометрические кривые Прайс-Джонса. Кривая Прайс-Джонса в группе больных ОЛЛ является одновершинной (рис.3.1.а).

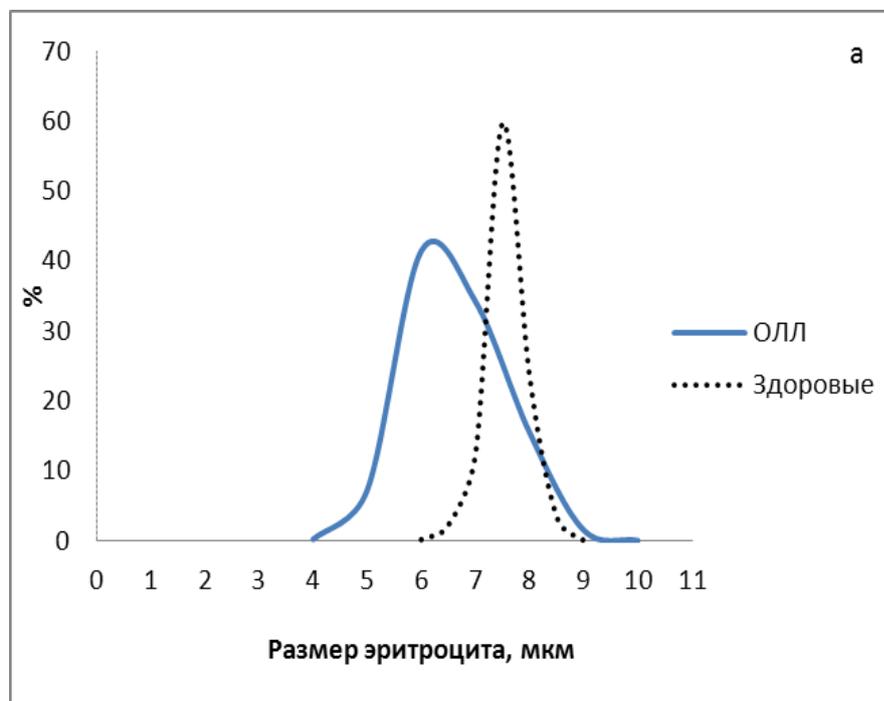


Рис. 3.1а. Кривая Прайс-Джонса больных ОЛЛ

Вершина кривой и основание смещены влево, что свидетельствует о преобладании числа микроцитов. В значительной степени широкое основание объясняется тем, что диаметры эритроцитов в периферической крови больных лейкозом сильно варьируют. Наименьшее значение среднего габарита микроцита составляет 4,0 мкм, а диаметр единично встречающихся макроцитов равен 10,1 мкм. Основная часть популяции клеток красной крови представлена микроцитами с диаметром от 6,0 до 6,5 мкм.

Кривая распределения эритроцитов по размеру в группе больных ОМЛ является одновершинной и отражает патологические процессы, протекающие в системе крови (рис.3.1.б).

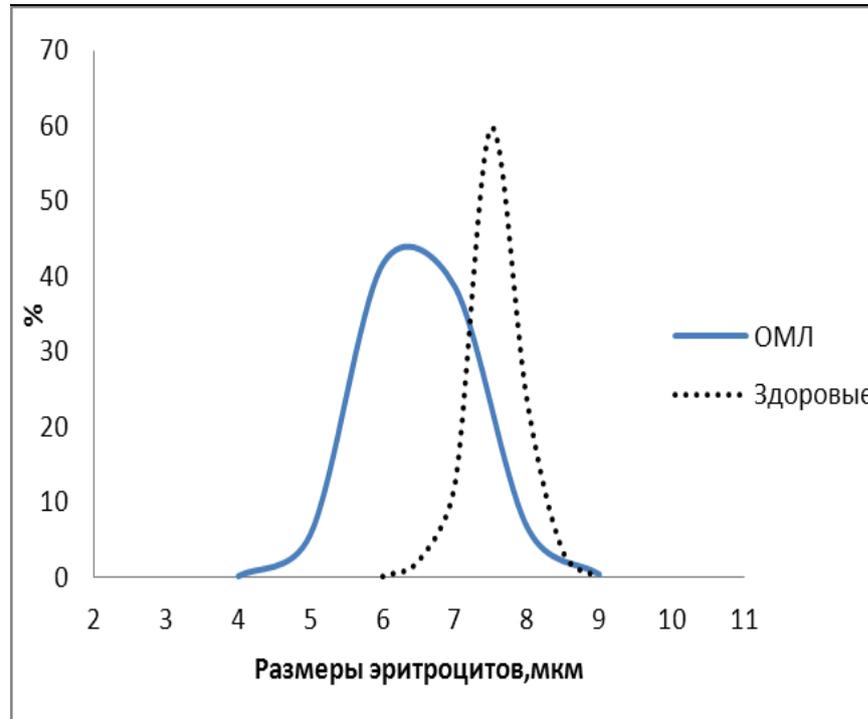


Рис.3.1.б. Кривая Прайс- Джонса больных ОМЛ.

Значительное смещение вершины и основания кривой в левую сторону, подтверждает преобладание в периферической крови больных эритроцитов малых размеров. Микроциты диаметром 6,2-6,4 мкм составляют 42% от общего числа эритроцитов.

Относительно симметричная кривая с широким основанием свидетельствует о значительной вариации диаметров клеток, что говорит об анизоцитозе эритроцитов. Общее число нормоцитов в крови снижено и составляет 46%. Значение габарита макроцитов у экспериментальной группы колеблется в пределах от 8,5 нм до 9,0 нм.

Распределение эритроцитов по диаметрам у больных ХЛЛ представлено на рис. 3.1.с.

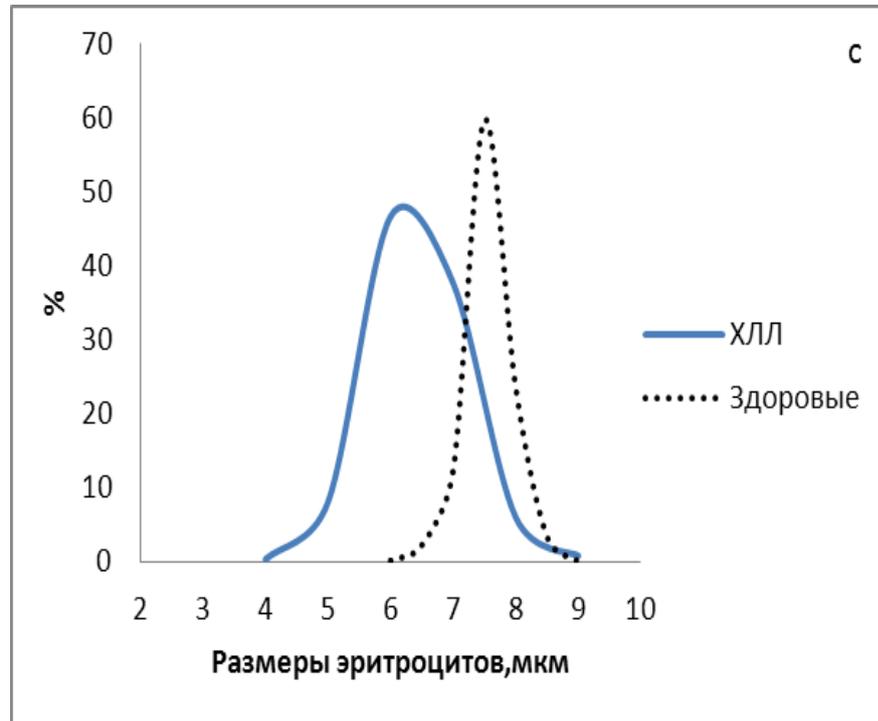


Рис.3.1.с. Кривая Прайс-Джонса у больных ХЛЛ.

Как видно из рисунка 3.1.с, у кривой Прайс-Джонса для больных ХЛЛ выявляется наличие широкого основания, доказывающего разнообразие диаметров эритроцитов в периферической крови от 4,0 мкм до 9,1 мкм. Несколько уплощенная форма и сдвиг кривой влево характеризует данную кривую как патологическую. Как и в случае предыдущих анализов эритроцитометрических кривых, в данной группе больных отмечается преобладание микроцитов с диаметром 6,0-6,5 мкм, что свидетельствует о микроцитозе. Количество нормоцитов размером 7,0-8,0 мкм, составляющих основную часть эритроцитов в крови у здоровых доноров, в группе больных ХЛЛ значительно снижено. Макроциты данной экспериментальной группы составляют наименьшую часть популяции эритроцитов – 1-4 %.

Распределение эритроцитов по диаметрам у больных ХМЛ представлено на рис. 3.1.д.

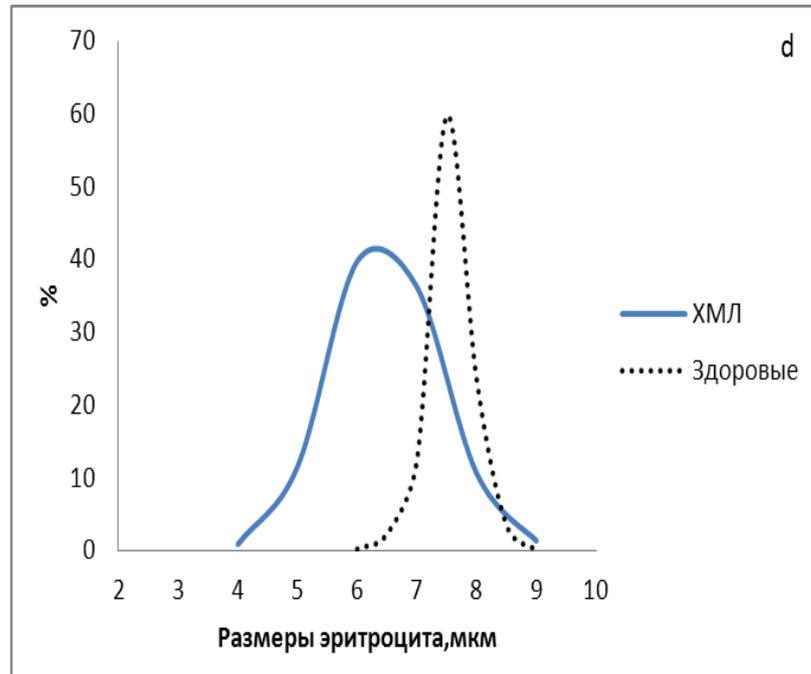


Рис.3.1.д. Кривая Прайс- Джонса больных ХМЛ.

Эритроцитометрическая кривая больных ХМЛ представляет собой кривую с широким основанием и уплощенной вершиной. В отличие от других исследуемых групп, распределение эритроцитов по диаметру больных ХМЛ наглядно свидетельствует об увеличении в периферической крови как микроцитарных форм, так и макроцитов. Согласно данным анализа, количество эритроцитов размером 8,5 мкм соответствует норме, однако число макроцитов большего диаметра превосходит таковое у контрольной группы.

Наличие эритроцитов диаметром от 4,1 мкм до 5,8 мкм, отсутствующих в крови здоровых доноров, подтверждает развитие патологического процесса. Пик кривой приходится на значения 6,2-6,6 мкм, что свидетельствует о микроцитозе клеток. Общее количество нормоцитов в крови больных лейкозом не соответствует норме.

Распределение эритроцитов по диаметрам у больных лимфомой представлено на рис. 3.1.е.

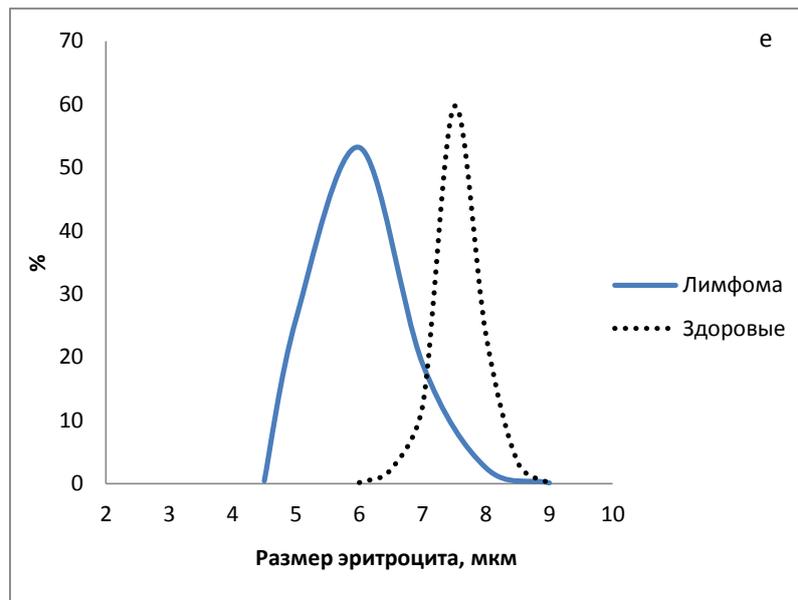


Рис. 3.1.е. Кривая Прайс-Джонса больных лимфомой.

Кривая Прайс-Джонса в группе больных лимфомой является одновершинной, несколько уплощенной кривой с широким основанием, и смещена влево. Сдвиг эритроцитометрической кривой в сторону доказывает преобладание в периферической крови эритроцитов малых диаметров. Так, пик кривой приходится на значение 6,0 мкм. Широкое, по сравнению с контролем, основание указывает на большой диапазон размеров эритроцитов. Наименьший встречающийся диаметр клеток составляет 4,6 мкм, а наибольший — 9,0 мкм. Количество нормоцитов в значительной степени снижено относительно здоровых людей, а макроциты представлены единичными клетками.

Таким образом, система красной крови реагирует на развитие злокачественных пролиферативных процессов анизоцитозом и появлением в кровотоке субпопуляции микроцитов, о чем свидетельствуют данные анализа кривых Прайс-Джонса. Развитие острого лейкоза как лимфоидного, так и миелоидного ростка кроветворения сопровождается снижением числа эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови, на фоне существенного повреждения субпопуляции нормоцитов, которые приобретают форму сфероцита с увеличенным диаметром. Адаптационные реакции эритроидного звена у больных острым мие-

лобластным лейкозом реализуются за счет микроцитарной субпопуляции. В результате в кровотоке больных ОМЛ возрастает число микроцитов со сниженным диаметром. В группе больных ОЛЛ существенно выраженное снижение числа эритроцитов и концентрации гемоглобина не компенсируется. Согласно данным кривых Прайс-Джонса основная часть субпопуляции этих больных представлена микроцитами, размер которых не отличается от контроля, а диаметр макроцитов снижен по сравнению с контролем. Это свидетельствует о высокой скорости старения субпопуляции нормоцитов, мембранные структуры которых изменяются вследствие патологических процессов, в результате чего они быстро переходят в пул макроцитов со сниженным диаметром.

В группе пациентов с диагнозом хронический как лимфо-, так и миелобластный типы лейкоза система красной крови менее подвержена повреждающим воздействиям, число эритроцитов и концентрация гемоглобина сохраняются на уровне, превышающим значения в контроле. Согласно данным кривых Прайс-Джонса, адаптационный резерв системы реализуется посредством субпопуляции микроцитов.

Выраженные изменения в системе красной крови установлены у пациентов с диагнозом лимфома. Адаптационный потенциал эритроидной популяции снижен, существенное снижение числа эритроцитов и гемоглобина практически в малой степени компенсируется микроцитарной субпопуляцией. При этом согласно данным кривых Прайс-Джонса снижение числа нормоцитов и единичные макроциты, выявленные в кровотоке, дополнены субпопуляцией микроцитов, размеры которых не отличаются от нормы.

3.2. Особенности лейкоформулы при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови

Результаты лейкоформулы в норме и при онкопатологии в системе крови представлены в таблице 3.3.

Лейкограмма больных с пролиферативными процессами в системе крови

Показатели	Контроль (n=10)	ОЛЛ (n=42)	ОМЛ (n=21)	ХЛЛ (n=10)	ХМЛ (n=6)	Лимфома (n=8)
WBC, 10^9 л^{-1}	$8,95 \pm 0,27$	$7,50 \pm 1,62^*$	$2,66 \pm ,73^*$	$25,9 \pm 0,35^*$	$9,6 \pm 0,2$	$10,1 \pm 0,3^*$
Нейтрофилы, %						
-юные	$0,5 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,3^*$	-	-	$0,4 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,2^*$
-палочкоядерные	$18,9 \pm 4,1$	$22,0 \pm 1,7^*$	$12,0 \pm 1,8^*$	-	$14,2 \pm 0,4^*$	$24,9 \pm 0,6^*$
-сегментоядерные	$32,1 \pm 3,6$	$24,1 \pm 3,0^*$	$27,3 \pm 4,3^*$	$9,5 \pm 3,1^*$	$45,0 \pm 1,3^*$	$21,6 \pm 1,9^*$
Эозинофилы, %	$0,8 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,04$	-	$0,9 \pm 0,6$	-	-
Базофилы, %	$0,2 \pm 0,01$	-	-	-	-	-
Лимфоциты, %	$44,8 \pm 3,7$	$34,9 \pm 3,5^*$	$41,7 \pm 5,6$	$42,8 \pm 7,6$	$28,5 \pm 1,1^*$	$30,1 \pm 7,3^*$
Моноциты, %	$0,9 \pm 0,02$	-	-	-	-	-

Примечания: WBC – число лейкоцитов; * статистическая значимость достоверности различий по сравнению со здоровыми донорами по критерию Уитни-Манна при $p < 0,05$.

Общее число лейкоцитов в группе больных ОЛЛ снижено на 22,0% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В лейкоформуле установлен сдвиг влево, за счет увеличения числа юных и палочкоядерных форм нейтрофилов (см. табл. 3.3). Однако число зрелых нейтрофилов на 25% ($p < 0,05$) снижено по сравнению с контролем. Моноциты и базофилы в крови больных отсутствовали.

У больных острым миелобластным лейкозом общее число лейкоцитов снижено на 70,3% ($p < 0,05$). Число палочкоядерных и сегментно-ядерных нейтрофилов снижено соответственно на 36,5% и 15,0% ($p < 0,05$) относительно контроля, при этом юные формы клеток не представлены. Изменение числа лимфоцитов, в данной экспериментальной группе, недостоверно, а присутствие остальных видов агранулоцитов не выявлено (см. табл. 3.3).

В группе больных ХЛЛ установлен лейкоцитоз, общее число белых клеток крови превышает норму ~ в 3 раза. В то же время, в крови больных на 70,4% ($p < 0,05$) снижено число зрелых нейтрофилов, на фоне отсутствия созревающих форм. Число эозинофилов и лимфоцитов достоверно не отличается от показателей в контрольной группе. Базофилы и моноциты в крови больных ХЛЛ отсутствуют.

У больных ХМЛ общее число лейкоцитов соответствует норме, однако в лейкоформуле отмечается сдвиг влево с увеличением числа нейтрофилов, на фоне снижения лимфоцитов. Так, число сегментно-ядерных нейтрофилов пре-

вышает контрольные показатели на 40,2% ($p < 0,05$), однако количество палочко-ядерных форм снижено на 24,9 % ($p < 0,05$). Процентное содержание лимфоцитов в крови больных ХМЛ на 36,4% ($p < 0,05$) снижено по сравнению с контролем.

В группе больных лимфомой общее число лейкоцитов увеличено на 12,8% ($p < 0,05$). Установлен сдвиг лейкоцитарной формулы влево с повышенным содержанием в крови созревающих форм нейтрофилов. При этом число юных нейтрофилов в группе больных превышает показатели в контроле в 4 раза. Число палочкоядерных форм увеличено на 32% ($p < 0,05$), однако количество зрелых нейтрофилов снижено на 33% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Базофилы и эозинофилы отсутствуют. Агранулярные лейкоциты представлены исключительно лимфоцитами, а их количество на 32,8% ($p < 0,05$) ниже по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, установлено, что в группе больных ОЛЛ и ХМЛ общее количество лейкоцитов практически не отличается от показателей нормы. В результате анализа лейкограммы больных острым миелобластным лейкозом установлена лейкопения, а в группах больных ХЛЛ и лимфомой отмечается лейкоцитоз. Низкие показатели числа лимфоцитов у больных ОЛЛ, лимфомой и ХМЛ и свидетельствуют о лимфоцитопении. В то же время повышенное содержание нейтрофилов в крови у последних, указывает на нейтрофилию. У всех перечисленных групп в периферической крови отсутствуют базофилы и моноциты, что говорит о развитии соответственно базо- и моноцитопении. В группах больных ОМЛ, ХМЛ и лимфомой отмечается анэозинофилия.

3.3. Морфология клеток крови при лейкозах

При микроскопировании мазков больных острым миелобластным типом лейкоза обнаружено наличие митозов в бластных формах на стадии телофазы, также присутствие атипичных бластов с большими вакуолями (рис. 3.3.1).

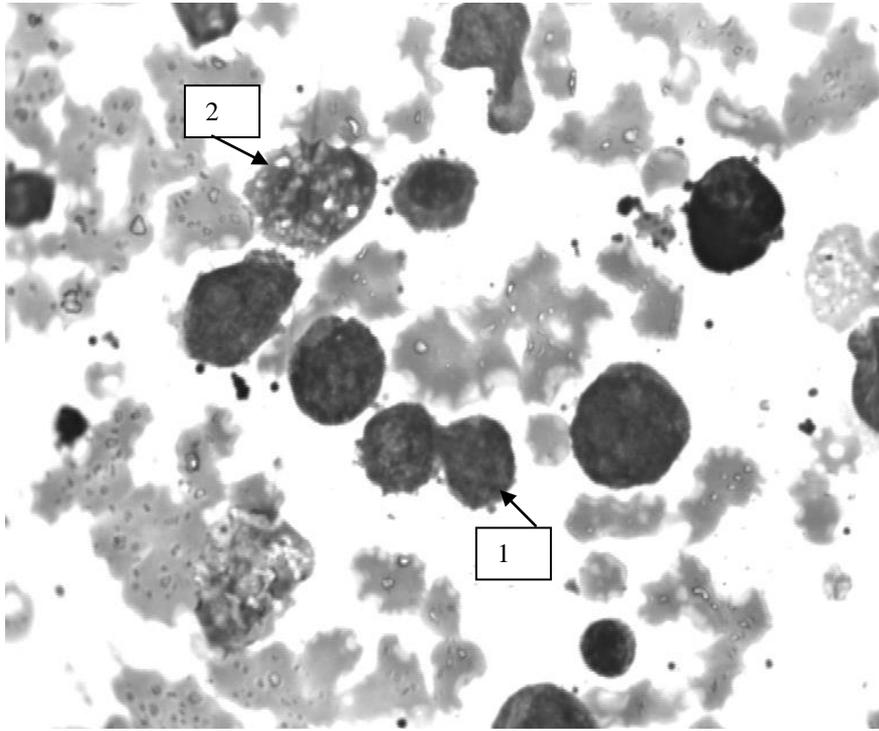


Рис. 3.3.1. Мазок периферической крови больного острым миелобластным лейкозом: 1 - делящийся миелобласт на стадии телофазы; 2 – атипичный бласт с вакуолями, ув. X1600

При развитии миелобластного лейкоза в крови обнаружены картины моноцентрического митоза, который связан с нарушением разделения центриолей. При этом образуется только один полюс с веретеном и большой чашеобразной метафазной пластинкой (рис. 3.3.2).



Рис. 3.3.2. Моноцентрический тип митоза у больного миелобластным лейкозом, ув. X1600

На мазке крови больных острым лимфобластным лейкозом идентифицированы бласты, для которых характерен полиморфизм ядра. Форма ядра от округ-

лой до неправильной, клетки с 2-3- ядрышками и очень узким ободком цитоплазмы (рис. 3.3.3).

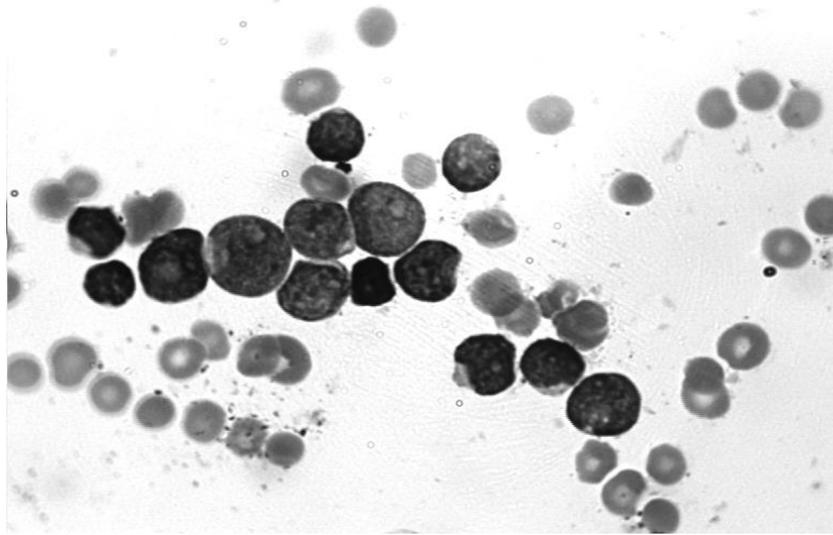


Рис. 3.3.3 Мазок крови больного острым лимфобластным лейкозом с полиморфными бластными клетками, ув. X1600.

При исследовании мазков больных острым лимфобластным лейкозом наблюдали картины деления бластов на стадии анафазы и телофазы (рис. 3.3.4).

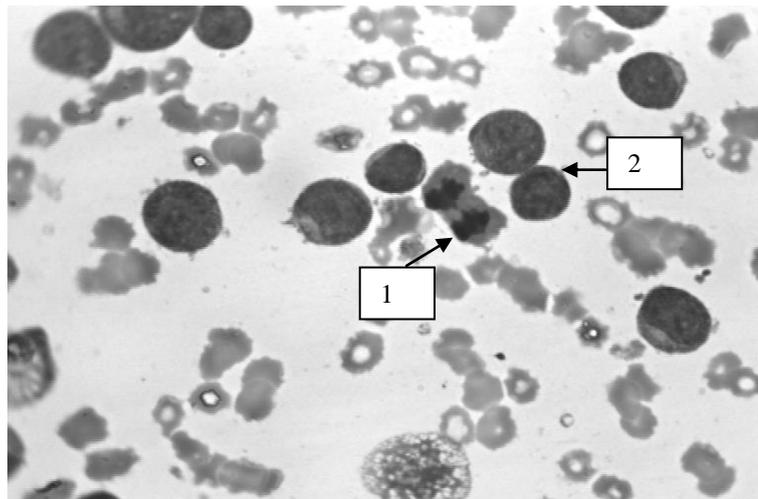


Рис. 3.3.4. Мазок периферической крови больного острым лимфобластным лейкозом: 1 - делящийся бласт на стадии анафазы; 2 – делящийся бласт на стадии телофазы.

В группе больных ХЛЛ на мазках периферической крови и костного мозга выявлены лимфобласты и атипичные лимфоциты разнообразной формы с гипо- и гиперхромными ядрами (рис. 3.3.5). По данным литературы, появление таких форм клеток происходит вследствие непостоянного содержания в них ДНК и изменения структуры хроматина (Sison, Brown, 2011).

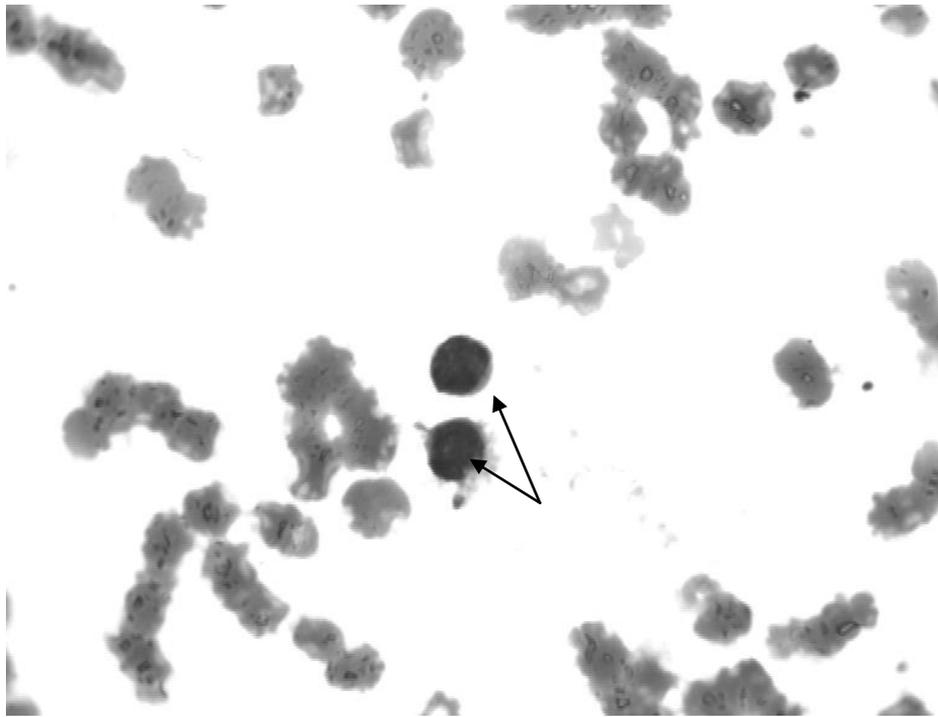


Рис. 3.3.5. Мазок крови больного хроническим лимфобластным лейкозом (стрелкой указаны лимфоциты), ув. X1600.

В периферической крови больных хроническим миелобластным лейкозом идентифицированы промиелоциты с плотным хроматином, который коагулирует и представлен в виде плотных сгустков в разных частях клетки (рис. 3.3.6).

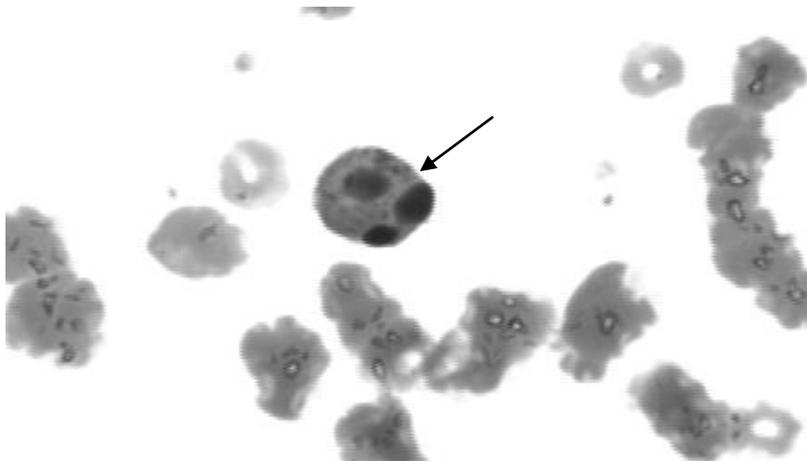


Рис. 3.3.6. Мазок крови больного хроническим миелобластным лейкозом (стрелкой указан промиелоцит), ув. X1600.

В целом, возникновение картин патологического митоза ведет к накоплению хромосомных мутаций и является одним из механизмов возникновения анеуплоидии и нарастания генетической гетерогенности клеточных популяций опухолевых клеток.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате выполненных исследований морфометрических характеристик эритроидной популяции при развитии пролиферативных процессов в системе крови установлена картина анизоцитоза. При всех видах онкопатологии в системе крови развивается сфероцитоз в субпопуляции нормоцитов, а адаптационный потенциал системы поддерживает микроцитарная субпопуляция. Морфологические структурные изменения красных клеток являются достаточно информативным критерием, позволяющим диагностировать состояние организма в целом. Эритроцит – один из важнейших носителей информации о процессах, протекающих на уровне тканевых структур организма (Бондарь, 2013). Установлено, что эритроциты вовлекаются в патологический процесс с нарушениями структуры и функций, при этом может происходить снижение сродства гемоглобина к кислороду, изменение механической прочности или скорости газообмена, деформация формы (Алачева, 2010).

Доказано, что необратимые изменения морфологии эритроцитов могут происходить при снижении содержания АТФ и накоплении внутриклеточного кальция, при изменении липидного состава мембраны или при нарушении структуры стериновой сети (Трошкина, 2007). Дефект состава мембраны эритроцитов приводит к повышению ее проницаемости для натрия и воды, которые поступают внутрь клетки. В связи с чем, эритроциты теряют свою двояковогнутую форму, уменьшаются в объеме (Караулько, 2008).

Анализ эритроцитометрических кривых больных различными видами лейкоза и лимфомой показал, что в системе крови большую часть эритроцитов составляют микроциты, что доказывает влияние развития пролиферативных процессов на морфометрические параметры эритроидной популяции. В крови больных онкопатологией общее число зрелых эритроцитов, способных полноценно функционировать, не соответствует норме. В связи с этим, увеличение числа микроцитов может являться причиной развития микроцитарной анемии, которая в большинстве случаев связана, так же, с дефицитом железа в организме (Вялов, 2015). Снижение уровня железа в крови, в свою очередь, влияет и на неадекватную выработку эритропоэтина (ЭПО), что является одной из причин

недостаточного кроветворения (Стуклов, 2014). Так же в научной литературе имеются данные о том, что микроцитоз может проявляться при наличии дефектного замедленного синтеза гемоглобина в результате чего, незрелые эритроциты делятся многократно (Поуэктова, 2011). Косвенно можно предположить, что развитие опухолевых процессов у больных ОЛЛ, ОМЛ, ХЛЛ, ХМЛ и лимфомой способствует патологическому протеканию эритропоэза.

Известный факт нарушения нормального кроветворения и присутствия бластных форм и незрелых лейкоцитов в крови больных лейкозом (Клочкова, 2016; Гиндина, 2017) подтверждается при микроскопировании мазков крови экспериментальных групп. Однако было установлено, что в группе больных ОМЛ развитие болезни сопровождается протеканием моноцентрических форм митоза у незрелых предшественников лейкоцитов. Развитие патологического митоза приводит к различного рода нарушениям хромосомного аппарата клеток, что сказывается на равномерном распределении генетического материала между дочерними ядрами. Нарастание генетической гетерогенности клеточных популяций и клеточный полиморфизм злокачественных опухолей представляет собой прямое следствие патологии митоза (Надыров, 2009). Так же в крови больных острым миелоидным лейкозом были отмечены патологичные формы бластов с большими вакуолями. Согласно данным литературы, одной из причин вакуолизации цитоплазмы клеток, является расширение полостей эндоплазматической сети, и данный факт характерен для ранней кратковременной стадии апоптоза. Физиологическая роль вакуолизации цитоплазмы при апоптозе состоит в выведении из цитоплазмы жидкости, что необходимо для ее компактизации при действии трансглутаминазы (Манских, 2004).

Доказано, что развитие опухолевого процесса оказывает влияние на популяцию лимфоидных клеток, а онкогены относят к эндогенным индукторам апоптоза (Антонеева, 2007). Таким образом, можно предположить, что апоптогенное действие опухоли распространяется и на бластные формы периферической крови больных. С другой точки зрения, явление вакуолизации считают защитной реакцией клетки на воздействие инородных секретлируемых белков, а вакуоли выступают в роли аутофагосом (Маркина, 2012). В связи с тем, что

этиология острых лейкозов окончательно не установлена, а в факторы риска включают генетическую предрасположенность, вирусы, ионизирующую радиацию и химические мутагены (Раижманов, 2015), данная гипотеза так же имеет место быть.

Исследование морфологических особенностей клеток крови в группе больных хроническими формами лейкоза показало наличие атипичных лимфоцитов разнообразной формы с гипо-и гиперхромными ядрами, что подтверждается фактами научной литературы как характерные признаки для данного заболевания.

Анализ лейкограмм больных острой и хронической формой лейкоза, а так же лимфомой показал отклонение в лейкоформулах от нормы. У больных всех экспериментальных групп наблюдали отсутствие в крови базофилов и моноцитов. Данный факт говорит о снижении защитных функций организма, так как известно, что перечисленные виды клеток составляют клеточное звено врожденного противовирусного иммунитета, а так же играют ведущую роль при развитии аллергических реакций (Собчак, 2014; Асирян, 2016). Вместе с тем, в ходе исследования было обнаружено, что у больных ХМЛ число нейтрофилов превышено более чем на 15 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Как известно, нейтрофилам так же принадлежит защитная функция и их роль при вирусных поражениях представляет особый интерес, за счет активации особых молекулярных структур, получивших название «toll-like receptors» (TLR). Выявлено, что активированные через TLR нейтрофилы способны более интенсивно развивать фагоцитарные реакции (Злотникова, 2014). Таким образом, можно предположить, что у больных хроническим миелолейкозом, из клеток гранулоцитарного ряда, нейтрофильная популяция является наиболее устойчивой, к развитию опухолевых процессов.

ВЫВОДЫ

1. Развитие острого лейкоза как лимфоидного, так и миелоидного ростка кроветворения сопровождается снижением числа эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови, в то время как хронический тип лейкоза характеризуется сохранением уровня гемоглобина и числа эритроцитов на уровне контрольных значений.
2. Развитие злокачественных пролиферативных процессов в системе крови сопровождается сфероцитозом в субпопуляции нормоцитов и появлением в кровотоке макро- и микроцитарных форм со сниженным диаметром.
3. Основную часть популяции эритроцитарной системы в группах больных лейкозом составляют микроциты. Кривые Прайс-Джонса патологичны – уплощенной формы, имеют широкое основание, смещены влево.
4. Острые формы лимфо- и миелобластного типов лейкоза сопровождаются лейкопенией в системе крови, которая в группе больных острым лимфобластным лейкозом протекает на фоне лимфоцитопении, в группе больных острым миелобластным лейкозом – на фоне нейтрофилоцитопении. Хронические формы лейкоза сопровождаются развитием лейкоцитоза.
5. В группе больных лимфомой установлена ярко выраженная анемия, которая характеризуется снижением почти в 2 раза числа эритроцитов и в 1,5 раза концентрации гемоглобина, эритроцитарная субпопуляция представлена микроцитами. Для системы белой крови характерно явление лейкоцитоза, протекающего на фоне лимфоцитопении и нейтрофилии.
6. Развитие опухолевых процессов сопровождается нарушением морфологии белых клеток крови. Так, при развитии миелобластного типа лейкоза наблюдается протекание моноцентрических форм митоза незрелых лейкоцитов, а так же идентифицированы бласты, с вакуолизацией цитоплазмы. В периферической крови больных хроническими типами лейкоза установлено присутствие атипичных лимфоцитов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТКЛ – Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома;

БХ - болезнь Ходжкина;

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ЛКМЗС – лимфома клеток маргинальной зоны селезенки;

МН – миелоидные новообразования;

ОЛ – острый лейкоз;

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз;

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз;

ОММЛ – острый миеломоноцитарный лейкоз;

ОПМЛ – острый промиелоцитарный лейкоз;

ПК – периферическая кровь;

ПНТКЛ – неспецифицированная Т-клеточная лимфома;

ППСК – плюрипотентные стволовые кроветворные клетки;

СОЭ – скорость оседания эритроцитов;

ХЛЛ – хронический лимфоидный лейкоз;

ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз;

ЭПО – эритропоэтин;

NCI (National Cancer Institute) – Национальный институт онкологии США;

FAB (French-American-British) – Французско-американско-британские системы классификации относящиеся к серии гематологических заболеваний;

REAL (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms) – Пересмотренная Европейско-американская классификация;

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров, К. М. Гематология [Текст] : Новейший справочник / К. М. Абдулкадыров. – Москва : Эксмо, 2004. – 928 с.
2. Андерсон, Ш. К. Атлас гематологии [Текст] / Ш. К. Андерсон, К. Б. Поулсен, И. А. Попова [и др.] – Москва : Логосфера, 2007. – 598 с.
3. Антонеева, И. И. Спонтанный индуцированный апоптоз лимфоцитов периферической крови больных раком яичников в динамике опухолевой прогрессии [Текст] / И. И. Антонеева, С. В. Бойчук // Иммунология. – 2007. – Т.9, № 2-3. – С. 272.
4. Асирян, Е. Г. Показатели фенотипа лимфоцитов и базофилов у детей с бронхиальной астмой [Текст] / Е. Г. Асирян // Вестник Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – №11. – С. 9-13.
5. Багиров, И. А. Прогностические факторы и результаты лечения острого лимфобластного лейкоза по протоколу ALL-MB-2002 у детей Беларуси и Азербайджана [Текст] / И. А. Багиров, Е. С. Лапотентова, О. В. Петина // Медицинские новости. – 2012. – №5. – С. 73-76.
6. Баранова, О. Ю. Острые лейкозы [Текст] / О. Ю. Баранова // Клиническая онкогематология. – 2012. – №3. – С.265-274.
7. Бондарь, Т. П. Регистрация функциональных отклонений клеток системы эритрон методом компьютерной морфометрии [Текст] / Т. П. Бондарь, О. А. Анфиногенова // Наука. Инновации. Технологии. – 2013. – №1. – С. 145-150.
8. Вакуолизация СНО-К1 под действием гемолизина под *Vibrio Cholerae* по1/попо 139 [Текст] / О. В. Маркина, Л. П. Алексеева, Н. Р. Телесманич [и др.] // Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы конф., Ростов-на-Дону, 06-07 июня 2012 г / ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. – Ростов на Дону. – 2012. – С. 95-98.
9. Волкова, М. А. Клиническая онкогематология [Текст] : руководство для врачей / М. А. Волкова. – Москва : Медицина, 2007. – 576 с.

10. Волкова, С. А. Основы клинической гематологии [Текст]: монография / С. А. Волкова, Н. Н. Боровков. — Н. Новгород : Издательство Нижегородской гос. медицинской академии, 2013. — 400 с.
11. Воробьев, А. И. Руководство по гематологии [Текст] : под ред. А. И. Воробьева. В 3 т. Т.1. — М. : Ньюдиамед. — 2002. — 280 с.
12. Вялов, С. С. Железодефицитные состояния: клиника, диагностика и возможности лечения [Текст] / С. С. Вялов // Клиническая фармакология терапия. — 2015. — Т. 24, №4. — С. 74-80.
13. Галеева, А. В. Клинический анализ крови в практике врача-педиатра [Текст] / А. В. Галеева, Э. А. Гайнуллина // Практическая медицина. — 2009. — №39. — С. 16-21.
14. Гематологический атлас [Текст] / Г. И. Козинец, Т. Г. Сарычева, С. А. Луговская [и др.]. — М. : Практическая медицина. — 2008. — 187с.
15. Гемопоз и его регуляция на различных стадиях дифференцировки гемопоэтических клеток костного мозга [Текст] / Н. П. Чеснокова, В. В. Моррисон, Е. В. Понукалина [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. — 2012. — №3. — С. 711-719.
16. Детиненко, И. Н. Сравнительная оценка информативности клеточной морфометрии и пункционной биопсии при хронической нефропатии трансплантата [Текст] : автореф. дисс. канд. мед. наук: 14.00.27 / И. Н. Детиненко. — Москва, 2006. — 22 с.
17. Дроздов, А. А. Заболевания крови. Полный справочник [Текст] / А. А. Дроздов, М. В. Дроздова // М. : Эксмо, 2008. — 151 с.
18. Захаров, А. В. Об одной методике классификации клеток крови и ее программной реализации [Текст] / А. В. Захаров, П. П. Кольцов Н. В. Котович // Программные продукты и системы. — 2014. — №4 (108). — С. 46-56.
19. Захаров, Ю. М. Черты информационной сигнализации, регулирующей гемопоз [Текст] / Ю. М. Захаров // Вестник РАМН. — 2002. — № 6. — С. 58-60.
20. Злотникова, М. В. Механизмы естественного и адаптивного иммунитета при инфекциях, вызванных вирусами простого герпеса 1 и 2 типа [Текст] / М. В.

Злотникова, И. А. Новикова // Проблемы здоровья и экологии. – 2014. – № 1 (39). – С. 7-14.

21. Знаменская, И. А. Агрегация тромбоцитов и некоторые регуляторные механизмы тромбоцитарного гемостаза у больных нестабильной стенокардией [Текст] : дисс. ... канд. мед. наук : 14.00.05 / И. А. Знаменская. – 2007. – 140 с.

22. Зуховицкая, Е. В. Лимфобластные лейкозы / Е. В. Зуховицкая, А. Т. Фиясь // ГрГМУ. – 2015. – №3 (51). – С. 12-17.

23. Иммунная система человека и особенности патогенеза герпетической инфекции (обзор) [Текст] / Д. М. Собчак, Н. Е. Волский, Т. А. Свинцова [и др.] // Современные технологии медицины. – 2014. – №3. – С. 118-127.

24. Иммунофенотипическая характеристика морфологических вариантов В-хронического лимфолейкоза [Текст] / А. В. Шибинская, М. А. Френкель, Н. А. Купрышина [и др.] // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2009. – №3. – С. 82-91.

25. Казанцева, И. А. Патология митозов в опухолях человека [Текст]: монография / И. А. Казанцева. – Новосибирск : Наука, 1981. – 144 с.

26. Караулько, И. В. Случай наследственной гемолитической микросфероцитарной анемии Миньковского-Шаффара [Текст] / И. В. Караулько // Журнал ГрГМУ. – 2008. – №4 (24). – С. 131-132.

27. Кларк, Э. Р. Микроскопические методы исследования материалов [Текст] / Э. Р. Кларк, К. Н. Эберхардт. – М. : Техносфера. – 2007. – 375 с.

28. Клинико-эпидемиологическая и молекулярно-генетическая характеристика острых лейкозов во взрослой клинике Новосибирского городского гематологического центра [Текст] / Ковынев И. Б., Поспелова Т. И., Тарновский Р. В. [и др.] // СМЖ. – 2017. – №2. – С. 62-66.

29. Ключкова, Г. Н. Гематологические показатели системы крови больных лейкозом [Текст] / Г. Н. Ключкова, С. С. Беляева, Т. С. Тикунова // Научный результат. Серия «Физиология». – 2016. – Т.2, №8. – С. 34-40.

30. Ключников, Д. Ю. Получение тромбоцитов человека в условиях *ex vivo* [Текст] / Д. Ю. Ключников // Известия Самарского научного центра РАН. – 2015. – №1-5. – С. 1233-1239.

31. Ковалева, Л. Г. Острые лейкозы [Текст] / Л. Г. Ковалева, К. М. Абдулкадыров. – М. : Медицина. – 1990. – 272 с.
32. Козинец, Г. И. Атлас клеток крови и костного мозга [Текст] / Г. И. Козинец. – М. : Триада-Х. – 1998. – 160с.
33. Коленкова, Г. В. Маркеры острого лейкоза в диагностике и прогнозе заболевания у детей [Текст] / Г. В. Коленкова // Гематология и трансфузиология. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 28-35.
34. Комарова, Н. К. Эритроцит периферической крови как тестобъект при изучении влияния экзогенных факторов на организм [Текст] / Н. К. Комарова, Т. Г. Свиридова, Л. В. Степовик [и др.] // Известия ОГАУ. – 2013. – №1(39). – С. 224-227.
35. Компьютерная морфометрия лимфоцитов периферической крови у больных пневмонией различного возраста [Текст] / И. Л. Давыдкин, О. И. Фёдорова, Н. О. Захарова [и др.] // Известия Самарского научного центра РАН. – 2010. – №1-7. – С. 1737-1741.
36. Кровь: клинический анализ, диагностика анемии и лейкозов, интерпретация результатов [Текст] / Г. И. Козинец, В. М. Погорелов, О. А. Дягилева [и др.]. – М. : Медицина XXI. – 2006. – 256 с.
37. Крячок, И. А. Особенности Т-клеточных лимфом [Текст] / И. А. Крячок, Е. С. Филоненко // Вестник гематологии. – 2014. – №1. – С. 48-55.
38. Кузнецов, М. М. Определение формы и размера эритроцитов при помощи метода псевдоцветового кодирования изображений [Текст] / М. М. Кузнецов, А. А. Марач, П. И. Петров. – Интерэкспо Гео-Сибирь. – 2013. –Т.5, № 1. – С. 257-261.
39. Кузнецов, С. Л. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии [Текст] / С. Л. Кузнецов, Н. Н. Мушкамбаров, В. Л. Горячкина. – М. : МИА, 2002. – 374 с.
40. Лечение волосатоклеточного лейкоза [Текст] / Е. В. Зуховицкая, А. Т. Фиясь, Е. Ф. Пищик // Журнал ГрГМУ. – 2013. – Т.3, № 43. – С. 112-114.
41. Лимфома Ходжкина [Текст] / А. А. Клименко, А. П. Ракша, А. А. Копелев [и др.] // Лечебное дело. – 2007. – №4. – С. 76-83.

42. Липунова, Е. А. Система красной крови: Сравнительная физиология [Текст] : Монография / Е. А. Липунова, М. Ю. Скоркина. – Белгород: БелГУ. – 2004. – 216 с.
43. Липунова, Е. А. Физиология крови [Текст]: моногр. исслед. / Е. А. Липунова, М. Ю. Скоркина. – Белгород : Изд-во БелГУ, 2007. – 324 с.
44. Луговская, С. А. Гематологический атлас [Текст] / С. А. Луговская, М. Е. Почтарь. – Тверь : Триада. – 2011. – 368 с.
45. Максимов и его революционное учение о мезенхимных стволовых клетках [Текст] / О. Д. Мяделец, Т. Н. Кичигина, В. Н. Грушин [и др.] // Вестник Витебского Государственного медицинского университета. – 2007. – Т.6, №3. – С. 139-147.
46. Манских, В. Н. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза [Текст] / В. Н. Манских // Бюллетень сибирской медицины. – 2004. – №1. – С. 63-70.
47. Морфологические особенности кроветворения у больных с хроническим миеломоноцитарным лейкозом [Текст] / А. К. Косанова, Г. А. Сабырбаева, Э. З. Габбасова [и др.] // Вестник КазНМУ. – 2015. – №1. – С. 134-136.
48. Морфометрическая характеристика лимфоцитов при апластической анемии [Текст] / Р. Н. Шишина, Д. Ф. Рахманова, С.Г. Потапова и [др.] // Гематология и трансфузиология. – 2009. – Т. 54, № 2. – С. 19-22.
49. Морфометрические показатели нейтрофилов крови у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / В. В. Гайнитдинова, Л. А. Шарифутдинова, Ю. С. Замула [и др.] // Вестник Башкирского ун-та. – 2015. – №1. – С. 106-110.
50. Морфофункциональное состояние клеток крови у женщин с физиологической беременностью в I триместре и при угрозе самопроизвольного выкидыша [Текст] / Ю. Б. Виноградская, И. А. Василенко, В. Е. Радзинский [и др.] // Новое в гематологии и клинической трансфузиологии: материалы конференции, Москва, 15-16 апреля 2003 г. – Москва. – 2003. – №2. – С. 35.
51. Муравьев, А. В. Анализ реологических изменений крови на основе концепции гемореологического профиля [Текст] / А. В. Муравьев, В. В. Якусевич,

А. В. Замышляев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 7. – С. 43-45.

52. Мыщик, А. В. Использование программы ImageJ для автоматической морфометрии в гистологических исследованиях [Текст] // Омский научный вестник. – 2011. – №2. – С. 187-189.

53. Нагаева, Т. А. Метод сканирующей электронной микроскопии в диагностике и лечении геморрагического васкулита у детей [Текст] / Т. А. Нагаева, И. И. Балашова, А. С. Саратиков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 5. – С. 12-14.

54. Назаренко, Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований [Текст] / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М. : Медицина. – 2007. – 541 с.

55. Новое в классификации ВОЗ В - клеточных опухолей лимфоидной ткани (Пересмотр 2016 г.) [Текст] / Д. Ф. Глузман, Л. М. Скляренко, Т. С. Ивановская [и др.] // Онкология. – 2017. – Т. 19, № 1. – С. 80-85.

56. О возможных дополнениях к современной схеме нормального кроветворения на основе изучения лейкемических бластных клеток [Текст] / Д. Ф. Глузман, Л. М. Скляренко, С. В. Коваль [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – №4. – С. 40-43.

57. Особенности морфологии и иммунофенотипа опухолевых клеток лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки (исследование с помощью клеточного биочипа) [Текст] / А. Н. Хвастунова, Л. Аль-Ради, О. С. Федянина [и др.] // Онкогематология. – 2017. – №1. – С. 71-77.

58. Острые лейкозы современные методы диагностики / Т. А. Мухтаров, В. В. Скворцов // Поликлиника. – 2016. – № 6. – С. 40-42.

59. Острый лейкоз у детей [Текст] / Е. В. Вильчевская, С. А. Коломенская, Е. Н. Марченко // Здоровье ребенка. – 2014. – № 6 (57). – С. 113-117.

60. Острый лимфобластный лейкоз с транслокацией t(4; 11)(q21; q23)/ kmt2a-aff1: результаты аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей и взрослых [Текст] / Т. Л. Гиндина, Н. Н. Мамаев, О. В. Паина [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2017. – №3. – С. 342-350.

61. Оценка морфофункциональных особенностей периферического отдела эритрона у детей с патологией органов дыхания [Текст] / Л. В. Алачева, С. Л. Сашенков, Д. К. Волосников [и др.] // Человек. Спорт. Медицина. – 2010. – №19 (195). – С. 38-42.
62. Пантелеев, М. А. Тромбоциты и гемостаз [Текст] / М. А. Пантелеев, А. Н. Свешникова // Онкогематология. – Москва: АБВ-пресс. №: 2. – 2014. – С. 65-73.
63. Патофизиология системы крови и гемостаза [Текст] / Н.Е. Максимович, К. А. Эйсмонт, М. Н. Ходосовский. – Гродно: УО «ГрГМУ». – 2010. – 344 с.
64. Педиатрия [Текст] под ред. А. А. Баранова. В 2 т. Т. 1. – Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2009. – 1024 с.
65. Петров, В. В. Тучные клетки, эозинофилы, CD45-положительные клетки в коже человека при физиологическом старении [Текст] / В. В. Петров // Морфология в теории и практике: материалы научн. конф., Чебоксары, 15 ноября 2012 г. – Чебоксары. – 2012. – С. 28-250.
66. Погорелов, В. М. Ключи к диагностике острых лейкозов (по следам утренних конференций института гематологии и интенсивной терапии гематологического научного центра РАМН) [Текст] / В. М. Погорелов, Г. И. Козинец // Гематология и трансфузиология. – 2008. – Т. 53, №5. – С. 27-31.
67. Погорелов, В. М. Принципы и возможности стандартизации морфоцитохимической диагностики острых лейкозов [Текст] / В. М. Погорелов, О. А. Дягилева, С. А. Луговская, Г. И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – №7. – С. 35-38.
68. Погорелов, В. М. Цветной атлас клеток системы крови [Текст] / В. М. Погорелов, Г. И. Козинец, О. А. Дягилева [и др.]. – М. : Практическая медицина. – 2016. – 176 с.
69. Полуэктова, О. Ю. Важнейшие анемии в общей врачебной практике. Гипорегенеративные анемии [Текст] / О. Ю. Полуэктова, Ю. Н. Токарев, В. И. Кузнецов [и др.] // Земский врач. – 2011. – Т.4, № 8. – С. 9-13.
70. Раимжанов, А. Р. Некоторые аспекты диагностики и лечения острых лейкозов. Литературный обзор [Текст] / А. Р. Раимжанов, И. А. Цопова, Ш. А. Мурзаматова // Вестник КРСУ. – 2015. – Т. 15, № 11. – С. 138-143.

71. Рубцова, Л. Ю. Особенности изменения диаметра эритроцитов в крови спортсменов в условиях физической нагрузки [Текст] / Л. Ю. Рубцова, Н. Н. Потолицына, Н.П. Монгалёв // В мире научных открытий. – Т. 9, №2. – 2017. – С. 121-141.
72. Рукавицын, О. А. Хронические лейкозы [Текст] / О. А. Рукавицын, В. П. Поп. – М. : БИНОМ. Лаб. знаний. – 2004. – 240 с.
73. Савченко, В. Г. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых [Текст] / В. Г. Савченко, Е. Н. Паровичникова, Б. В. Афанасьев [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.59, № 1. – С. 2-29.
74. Свирновский, А. И. Хронический лимфоцитарный лейкоз : парадигмы и парадоксы [Текст] / А. И. Свирновский / Медицинские новости. – 2008. – №13. – С. 7-19.
75. Сидорова, Е. В. Долгоживущие В-клетки [Текст] / Е. В. Сидорова // Успехи современной биологии. – 2013. – Т.133, № 4. – С. 333–348.
76. Скоркина, М. Ю. Морфология клеток крови и костного мозга при развитии миелопролиферативных процессов в системе крови [Текст] / М. Ю. Скоркина, Т. С. Тикунова, С. С. Беляева // Научный результат. Серия «Физиология». – 2015. – Т.1, №3. – С. 5-10.
77. Случай острого мегакариобластного лейкоза [Текст] / Е. Н. Никитин, Н. А. Кирьянов, Д. Н. Миклин [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2012. – Т.57, №4. – С. 41-43.
78. Смирнова, О. В. Особенности клеток иммунной системы при остром лимфобластном лейкозе [Текст] / О. В. Смирнова, В. Т. Манчук // Медицинская иммунология. – 2013. – №6. – С. 577-584.
79. Соболева, Т. Н. Морфология клеток крови в нормальном кроветворении [Текст]: методические рекомендации для врачей-лаборантов и гематологов / Т. Н. Соболева, Е. Б. Владимирская. – М. : Издательство «ЮНИМЕД-пресс», 2003. – 32 с.

80. Совершенствование комплексной диагностики острых лейкозов у детей в Республике Беларусь [Текст] / О. В. Алейникова, С. Е. Буглова, А. М. Кустанович [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 42-44.
81. Соколинский, Б. З. Количественная морфология эритроцитов периферической крови и эритроцитов костного мозга при острых лейкозах и депрессиях кроветворения [Текст] / Б. З. Соколинский, А. М. Пятницкий // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 2. – С. 39-41.
82. Стуклов, Н. И. Изменение эритроцитарных показателей и роль пероральных препаратов железа у пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения с анемией [Текст] / Н. И. Стуклов, Е. В. Сарапова // Поликлиника. – 2014. – № 1. – С. 41-44.
83. Сыроешкин, А. В. Новый подход к исследованию патофизиологии клетки: изучение распределения клеток по размерам и форме как метод диагностики и мониторинга заболеваний [Текст] / А. В. Сыроешкин, Т. В. Гребенникова, В. Н. Байкова // Клиническая лабораторная диагностика – 2002. – № 5. – С. 35-40.
84. Трифонов, Е. В. Антропология: дух – душа – тело – среда человека, или Пневмапсихосоматология человека [Электронный ресурс] / Е. В. Трифонов. – Санкт Петербург, 2015. – Режим доступа: http://www.tryphonov.ru/tryphonov/indpphy1a_r.htm.
85. Трошкина, Н. А. Эритроцит : строение и функции его мембраны [Текст] / Н. А. Трошкина, В. И. Циркин, С. А. Дворянский // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 2-3. – С. 32-40.
86. Тумян, Г. С. Злокачественные лимфомы [Текст] / Г. С. Тумян // Клиническая онкогематология. – 2009. – №1. – С. 91-96.
87. Уфимцева, В. Ю. Динамическое исследование тромбоцитопоза у доноров тромбоцитов [Текст] : дис. ... канд. мед. наук: 456271 / Ю. В. Уфимцева. – Москва, 2012. – 93 с.
88. Фёдорова, О. И. Диагностическое значение компьютерной морфометрии моноцитов периферической крови у больных пневмонией различного возраста [Текст] / О. И. Фёдорова, И. Г. Давыдки, А. М. Осадчук // Медицинский альманах. – 2011. – №5. – С. 276-278.

89. Фиясь, А.Т. Т-лимфобластный лейкоз/лимфома [Текст] / А. Т. Фиясь, Е. В. Зуховицкая, О. П. Чайковская // Журнал ГрГМУ. – 2013. – №2. – С. 109-111.
90. Фритц, Э. Международная классификация болезней – онкология (МКБ-О) [Текст] / Э. Фритц, Э. Перси, Э. Джек [и др.]. – СПб. : Вопросы онкологии. – 2017. – 352 с.
91. Ходулева, С. А. Современные аспекты лабораторной диагностики острых лейкозов [Текст] / С. А. Ходулева, Д. В. Кравченко // Проблемы здоровья и экологии. – 2010. – № 4. – С. 96-101.
92. Хронический миелолейкоз: многолетний опыт таргетной терапии [Текст] / К. М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2016. – №1. – С. 54-60.
93. Худоевков, Р. М. Методы компьютерной морфометрии в нейроморфологии [Текст] / Р. М. Худоевков. – М. : ФГБУ «НЦН» РАМН. – 2014. – 53 с.
94. Цитологические и цитогенетические маркеры как показатель агрессивности течения рака молочной железы [Текст] / Э. А. Надыров, С. Б. Мельнов, Ю. В. Малиновская [и др.] // ГрГМУ. – 2009. – Т. 28, № 4. – С. 63-65.
95. Шиффман, Ф. Д. Патофизиология крови [Текст]: монография / Ф. Д. Шиффман. – СПб. : БИНОМ – "Невский Диалект". – 2000. – 448 с.
96. Шмаров, А. Д. О корреляции размеров эритроцитов и субпопуляций лимфоцитов у здоровых детей [Текст] / А. Д. Шмаров, О. А. Кизенко, Л. В. Соболевская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 11. – С. 23.
97. Эозинофилия [Текст] / Н. Т. Ватутин, Н. В. Калинкина, И. А. Петуева [и др.] // Университетская клиника. – 2012. – Т.8, №1. – С. 67-72.
98. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group [Текст] / N. L. Harris, E. S. Jaffe , H. Stein et al. // Blood. – 1994. – №84 (5). – P. 92.
99. Alessandrini, A. AFM: a versatile tool in biophysics [Текст] / A. Alessandrini, P. Facci // Meas. Sci. Technol. – 2005. – V. 16. – P. 65-92.
100. Bischoff, G. Micro- and nanostructures of biological system [Текст] / G. Bischoff, H. J. Hein. – Aachen: Shaker Verlag, 2003. – V. 1. – 160 p.

101. Chattopadhyay, P. K. Cytometry: Today's technology and tomorrow's horizons [Текст] / P. K. Chattopadhyay, M. Roederer // *Methods*. – 2012. – V. 57, № 3. – P. 251–258.
102. Chute, C. G. Clinical classification and terminology: some histories and current observations [Текст] / C. G. Chute // *College of American Pathologists. – Proceedings of the AMIA Annual Fall Symposium*. – 2000. – V. 7, № 3. – P. 298-303.
103. Clinical Utility of Reticulocyte Parameters [Текст] / E. Piva, C. Brugnara, F. Spolaore et. al. // *Clinics in Laboratory Medicine*. – 2015. – V. 35, № 1. – P. 133-163.
104. Hansma, H. J. Surface biology of DNA by atomic force microscopy [Текст] / H. J. Hansma // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2001. – V. 52. – P. 71-92.
105. Hazlenhurst, L. Signaling networks associated with BCR-ABL depends transformation [Текст] / L. Hazlenhurst, N. Bewry, R. Nair et al. // *Cancer control*. – 2009. – V. 16. – P. 100-107.
106. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease [Текст] / P. Travers, M. Walport et al. // *Garland Science*. – 2001. – 732 p.
107. International classification of diseases for oncology (ICD-O) 3rd edition, 1st revision [Текст] / F. April, P. Constance J. Andrew et. al. – *World Health Organization*. – 2013. – 242 p.
108. Percy, C. International Classification of Diseases for Oncology [Текст] / C. Percy, V. Van Holten, C. Muir // *World Health Organization*. – 1990. – 49 p.
109. Pieper, K. Cell biology and development [Текст] / K. Pieper, B. Grimbacher, H. Eibel // *Allergy and Clinical Immunology*. – 2013. – V.131, № 4. – P. 959 –971.
110. Ribatti, D. The discovery of plasma cells: An historical note [Текст] / D. Ribatti // *OImmunology Letters*. – 2017. –V.188. – P. 64-67.
111. Sison, E. A. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting [Текст] / E. A. R. Sison, P. Brown // *Expert Rev Hematol*. – 2011. –V. 4(3). – P. 271-283.
112. Splenic marginal zone lymphoma: characteristics and treatment [Текст] / U. Julhakyanyan, A. Magomedova, S. Kravchenko et al. // *Haematologica*. – 2011. – V. 97, № 5. – P. 638-640.

113. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications [Текст] / E. Campo, S. H. Swerdlow, N. L. Harris et al. // Blood. – 2011. – V. 117, № 19. – P. 5019-5032.

Выпускная квалификационная работа выполнена мной самостоятельно.
Все использованные материалы из опубликованной научной литературы и других источников имеют ссылки на них.

« ____ » _____ ____ Г.

(Ф.И.О.)