

Морфология эритроцитов периферической крови при раке яичников

Антонина Юрьевна Федотова*, Татьяна Петровна Генинг,
Татьяна Владимировна Абакумова, Динара Ришатовна Долгова

Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия

Реферат

Цель. Оценка морфологии циркулирующих эритроцитов больных раком яичников III стадии.

Методы. Объектом исследования послужили эритроциты периферической крови первичных больных раком яичников (n=25), находившихся на III стадии по классификации Международной федерации акушеров-гинекологов. Больные были обследованы в гинекологическом отделении Ульяновского областного клинического онкологического диспансера. В контрольную группу вошли 25 соматически здоровых женщин. Морфологические исследования проводили с помощью световой микроскопии. Количество эритроцитов с неизменённой и изменённой формами выражали в процентах. Методом атомно-силовой микроскопии изучали топологию и ригидность эритроцитов.

Результаты. Установлено статистически значимое снижение количества эритроцитов циркулирующей крови у больных раком яичников по сравнению с соматически здоровыми женщинами. При этом резко снижено количество дискоцитов при одновременном увеличении количества морфологически изменённых форм (эхиноцитов, стоматоцитов, сфероцитов) и повышена ригидность эритроцитов.

Вывод. На фоне появления изменённых форм эритроцитов, увеличения показателей индекса трансформации и возрастания ригидности эритроцитов у больных раком яичников III стадии происходит снижение общего числа эритроцитов в циркулирующей крови по сравнению с соматически здоровыми женщинами.

Ключевые слова: рак яичников, эритроциты, эхиноциты, индекс трансформации.

Для цитирования: Федотова А.Ю., Генинг Т.П., Абакумова Т.В., Долгова Д.Р. Морфология эритроцитов периферической крови при раке яичников. *Казанский мед. ж.* 2019; 100 (5): 855–859. DOI: 10.17816/KMJ2019-855.

Peripheral blood erythrocytes morphology in ovarian cancer

A.Yu. Fedotova, T.P. Gening, T.V. Abakumova, D.R. Dolgova
Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

Abstract

Aim. To assess the morphology of circulating red blood cells in patients with stage III ovarian cancer.

Methods. The object of the study was the peripheral blood erythrocytes of primary patients with ovarian cancer (n=25) who had stage III according to International Federation of Gynecology and Obstetrics. Patients were examined in the gynecological department of Ulyanovsk Regional Clinical Oncology Center. The control group included 25 somatically healthy women. Morphological studies were performed using light microscopy. The number of red blood cells with an unchanged and altered shape was expressed as a percentage. By the method of atomic force microscopy, the topology and rigidity of red blood cells was studied.

Results. A statistically significant decrease in the number of circulating blood erythrocytes was found in patients with ovarian cancer compared to somatically healthy women. At the same time, the number of discocytes is markedly reduced while the number of morphologically altered forms: echinocytes, stomatocytes, spherocytes and erythrocyte rigidity are increased.

Conclusion. With the appearance of altered forms of red blood cells and increase of the transformation index and erythrocyte rigidity in patients with stage III ovarian cancer, total number of red blood cells decreases in circulating blood compared to somatically healthy women.

Keywords: ovarian cancer, red blood cells, echinocytes, transformation index.

For citation: Fedotova A.Yu., Gening T.P., Abakumova T.V., Dolgova D.R. Peripheral blood erythrocytes morphology in ovarian cancer. *Kazan medical journal.* 100 (5): 855–859. DOI: 10.17816/KMJ2019-855.

Рак яичников (РЯ) занимает одно из ведущих мест по частоте возникновения и смертности среди злокачественных новообразований у женщин репродуктивного возраста.

Сегодня основное внимание исследователей направлено на тканевую гипоксию, возникающую в солидных опухолях в динамике опухолевого прогрессирования [1–2]. При этом указывают на возможность возникновения под влиянием гипоксии протеомных и геномных нарушений в опухолевых клетках, определяющих гетерогенность опухоли и агрессивное течение опухолевого процесса [3–4].

Основной причиной гипоксии опухоли, как правило, бывают нарушения её сосудистой системы. Снижение кислородотранспортной функции циркулирующих эритроцитов при этом не рассматривают, хотя, помимо негативного влияния на все системы организма-опухоленосителя, вероятно, оно будет усиливать гипоксию опухоли.

Главный фактор, способствующий выживанию эритроцитов, — их способность деформироваться. Деформируемость эритроцитов определяет реологические свойства крови, характеризуется значительной вариабельностью формы эритроцитов и зависит от трёх основных факторов: эластичности мембраны, внутренней вязкости содержимого клеток, отношения поверхности клеток к их объёму.

Интерес к изучению деформируемости эритроцитов обусловлен тем, что ригидные эритроциты способны окклюзировать часть капиллярного русла и таким образом блокировать кровообращение в системе микроциркуляции. В публикациях, посвящённых изучению морфологических параметров эритроцитов при канцерогенезе, представлены экспериментальные данные и результаты, полученные при некоторых локализациях опухоли. Последние позволяют предполагать значение биологического портрета опухоли в изменении спектра морфологических характеристик эритроцитов циркулирующей крови организма-опухоленосителя [5–6].

Цель исследования — изучить морфологию циркулирующих эритроцитов у больных РЯ III стадии.

Объектом исследования послужили эритроциты периферической крови первичных больных РЯ (n=25), находившихся на III стадии по классификации Международной федерации акушеров-гинекологов (FIGO — от англ. International Federation of Gynecology and Obstetrics). Подбор пациенток проводили по строго определённым критериям:

- возраст 48–60 лет (включительно);
- отсутствие острых воспалительных заболеваний;
- отсутствие в анамнезе хирургических вмешательств давностью менее года (включая стоматологические).

Больные были обследованы в гинекологическом отделении Ульяновского областного клинического онкологического диспансера. В контрольную группу вошли 25 соматически здоровых женщин. Информированное письменное согласие было получено у всех больных.

Исследование когортное, проведено согласно требованиям комиссии по этике Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (протокол №3 от 15.03.2015).

Морфологические исследования проводили с использованием световой микроскопии Nikon Eclipse E 200. Эритроциты оценивали по классификации Г.И. Козинца [7], согласно которой клетки с признаками эхиноцитарной трансформации (дискоциты, дискоциты с одним выростом, дискоциты с гребнем, дискоциты с множественными выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды) относят к обратимо деформированным, а куполообразные эритроциты, сфероциты с гладкой поверхностью, сфероциты с шипиками на поверхности, эритроциты в виде «спущенного мяча», дегенеративные формы эритроцитов — к необратимо деформированным формам. Количество эритроцитов с неизменённой и изменённой формами выражали в процентах, подсчёт производили на 300 эритроцитов.

Были использованы следующие расчётные индексы [7].

1. Индекс трансформации (ИТ) — количественная оценка соотношения патологических и нормальных форм эритроцитов:

$$\text{ИТ} = (\text{ОД}\% + \text{НД}\%) / \text{Д}\%,$$

где Д% — процент дискоцитов; ОД% — процент обратимо деформированных эритроцитов; НД% — процент необратимо деформированных эритроцитов.

2. Индекс обратимой трансформации (ИОТ):

$$\text{ИОТ} = \text{ОД}\% / \text{Д}\%.$$

3. Индекс необратимой трансформации (ИНОТ):

$$\text{ИНОТ} = \text{НД}\% / \text{Д}\%.$$

Исследование топологии эритроцитов у больных РЯ III стадии и контрольной группы проводили на атомно-силовом микроско-

Таблица 1. Количество различных форм эритроцитов циркулирующей крови больных раком яичников III стадии и соматически здоровых женщин (%)

Показатели	Контрольная группа (n=25)	Больные раком яичников (n=25)	p
Дискоциты	94,2±0,5	32,5±0,5*	0,0003
Эхиноциты	5,6±0,07	59,6±0,2*	0,0003
Стоматоциты	0,12±0,02	3,2±0,3*	0,0005
Сфероциты	0,12±0,02	4,7±0,3*	0,0002

Примечание: *статистически значимые отличия по сравнению с показателями контроля ($p \leq 0,05$).

Таблица 2. Показатели соотношения патологических и нормальных форм эритроцитов циркулирующей крови у больных раком яичников и соматически здоровых женщин

Группы	Индекс трансформации эритроцитов, %	Индекс обратимой трансформации эритроцитов, %	Индекс необратимой трансформации эритроцитов, %
	Me (Q_1-Q_3)		
Контрольная (n=25)	0,122 (0,120–0,124)	0,110 (0,100–0,130)	0,011 (0,010–0,013)
III стадия рака яичников (n=25)	2,382* (2,286–2,670)	0,793* (0,690–0,952)	1,589* (1,450–1,760)

Примечание: *статистически значимые отличия по сравнению с показателями контроля ($p \leq 0,05$).

пе Solver Pro (NT-MDT, Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме. Получали как 2D-, так и 3D-изображение. Были использованы фирменные кремниевые зонды с жёсткостью 0,2 Н/м, радиус закругления кончика зонда составлял около 10 нм.

Во всех исследуемых группах оценивали ригидность мембраны эритроцита по модулю Юнга. Для его вычисления (программное обеспечение Nova, NT-MDT, Россия) снимают кривые DFL (z) в центральной части каждой клетки. Затем на полученных силовых кривых находят значения DX (нм), DY (нН), Y (нН), согласно которым производят расчёт глубины проникновения зонда в образец:

$$x = \Delta Z \cdot (\text{SetPoint} - \text{DFL}_0).$$

Расчёт силы прижатия зонда к образцу производили согласно закону Гука ($F = k \cdot x$) с последующим расчётом модуля Юнга [8], согласно теории Герца, описывающей контактную деформацию двух тел. Число точек в скане составляло 600. Поле сканирования имело размеры 100×100, 50×50 мкм.

При статистическом анализе полученные данные представляли как медиану с интерквартильным размахом Me (Q_1, Q_2, Q_3) или вычисляли среднее значение определяемых показателей и стандартное отклонение при нормальном распределении. Для оценки различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, где

не требуется наличия нормального распределения сравниваемых групп. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Мы установили статистически значимое ($p \leq 0,05$) снижение количества эритроцитов в циркулирующей крови у больных РЯ по сравнению с показателем у соматически здоровых женщин ($4,11 \pm 0,190 \times 10^{12}/л$ против $4,68 \pm 0,051 \times 10^{12}/л$). В ряде исследований при солидных опухолях различной локализации также отмечено снижение количества эритроцитов циркулирующей крови [9, 10]. Этот факт, а также появление дегенеративных форм эритроцитов в циркулирующей крови организма-опухоленосителя при ряде локализаций опухоли авторы объясняют токсическим влиянием опухоли.

В результате проведённых исследований нами установлено снижение количества двояковогнутых дискоцитов и повышение изменённых эритроцитов — эхиноцитов, стоматоцитов, сфероцитов (табл. 1). Эхиноцит считают обратимо деформируемым до стадии потери мембранного вещества [11].

Появление эхиноцитарных форм эритроцитов у больных РЯ при неопластических процессах, возможно, связано с изменением ионной проницаемости мембраны, нарушением работы ионных каналов. После дальнейшего воздействия неоплазмы эхиноцит приобретает сферическую форму. При необратимой транс-

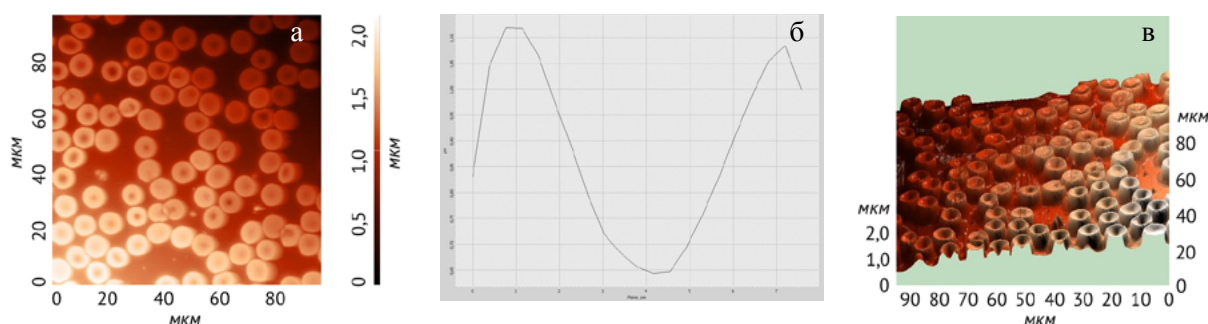


Рис. 1. Топология (а), боковое сечение профиля (б) и изображение в 3D (в) у соматически здоровых женщин

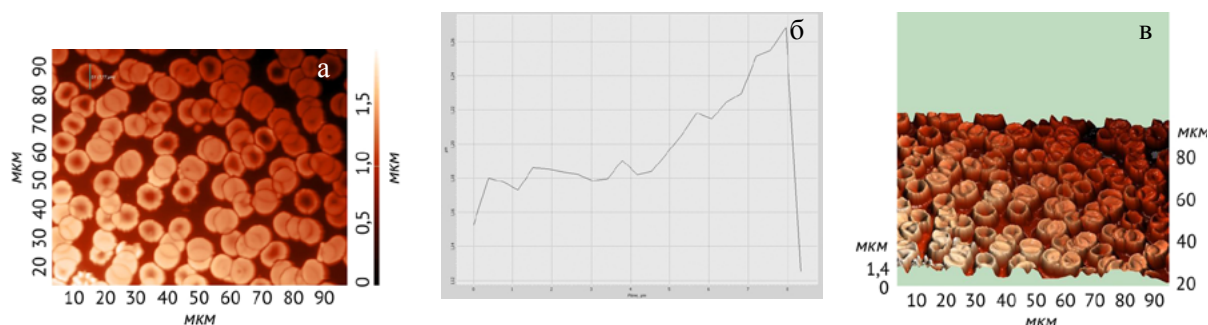


Рис. 2. Топология (а), боковое сечение профиля (б) и изображение в 3D (в) у больных раком яичников

формации дискоцита в сфероцит выросты плазмолеммы превращаются в произвольные микросферулы [12].

Соотношение нормальных и морфологически изменённых эритроцитов демонстрируют индексы трансформации. Представленные данные (табл. 2) показывают, что у больных РЯ III стадии статистически значимо повышен индекс трансформации эритроцитов относительно группы сравнения. Параллельно отмечено повышение индекса обратимой трансформации и индекса необратимой трансформации эритроцитов у больных РЯ III стадии относительно соматически здоровых женщин.

Благодаря высокому пространственному разрешению атомно-силового микроскопа на сегодняшний день он служит основным инструментом для изучения рельефа биологического объекта. Метод атомно-силовой микроскопии предоставляет возможность изучать параметры клеток, не прибегая к длительной и сложной фиксации, тем самым минимально искажая получаемую информацию. Он позволяет оценивать упругие свойства поверхности клеток и обеспечивает получение пространственного изображения поверхности [13].

Результаты, полученные с использованием атомно-силовой микроскопии, позволяют предполагать изменение распределения вну-

триклеточного содержимого (на это указывают профили бокового сечения) и топологии эритроцитов больных РЯ по сравнению с эритроцитами соматически здоровых женщин (рис. 1,2). Появление обратимых форм — эхиноцитов у больных РЯ III стадии приводит к повышению индекса трансформации эритроцитов и увеличению ригидности ($16,2 \pm 0,449$ кПа против контроля $7,88 \pm 0,326$ кПа).

ВЫВОД

На фоне появления изменённых форм эритроцитов, увеличения показателей индекса трансформации и возрастании ригидности эритроцитов у больных раком яичников III стадии происходит снижение общего числа эритроцитов в циркулирующей крови по сравнению с соматически здоровыми женщинами.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vaupel P., Thews O., Hoeschel M. Treatment resistance of solid tumors. *Med. Oncol.* 2001; 18: 243–259. DOI: 10.1385/MO:18:4:243.
2. Vaupel P., Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular re-

sponse. *Oncologist*. 2004; 9: 4–9. DOI: 10.1634/theoncologist.9-90005-4.

3. Schito L., Rey S. Hypoxic pathobiology of breast cancer metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*. 2017; 1868: 239–245. DOI: 10.1016/j.bbcan.2017.05.004.

4. Wolff M., Kosyna F.K., Dunst J. et al. Impact of hypoxia inducible factors on estrogen receptor expression in breast cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2017; 613: 23–30. DOI: 10.1016/j.abb.2016.11.002.

5. Сипров А.В., Соловьёва М.А. Морфофункциональное состояние эритроцитов крыс с карциномой Walker-256 при сочетанном применении доцетаксела и ксимедона. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2017; (7): 56–60. [Siprov A.V., Solov'eva M.A. Morphofunctional state of erythrocytes of rats with carcinoma Walker-256 in combined use of docetaxel and ximedon. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2017; (7): 56–60. (In Russ.)]

6. Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю., Забиняков Н.А. Морфофункциональные особенности клеток крови в условиях опухолевого роста. *Биомедицина*. 2013; (3): 63–67. [Sladkova E.A., Skorkina M.Yu., Zabinyakov N.A. Morphological and functional peculiarities of blood cells at tumor growth condition. *Biomeditsina*. 2013; (3): 63–67. (In Russ.)]

7. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А. и др. *Клетки крови. Современные технологии их анализа*. М.: Триада-Фарм. 2002; 200 p. [Kozinets G.I., Pogorelov V.M., Shmarov D.A. et al. *Kletki krovi. Sovremennye tekhnologii ih analiza*. (Blood cells. Modern technologies of their analysis.) Moscow: Triada-Farm. 2002; 200 p. (In Russ.)]

8. Henderson R.M., Oberleithner H. Pushing, pulling, dragging, and vibrating renal epithelia by using atomic

force microscopy. *AJP Renal Physiol*. 2000; 278 (5): 689–701. DOI: 10.1152/ajprenal.2000.278.5.F689.

9. Даулетпаева Ж.О., Дёмина Е.В., Паньшина С.С. Состояние параметров красной периферической крови при наличии опухолей лёгкого. *Sci. Time*. 2016; (5): 159–160. [Dauletpaeva Zh.O., Demina E.V., Pan'shina S.S. State of peripheral red blood parameters in the presence of lung tumors. *Sci. Time*. 2016; (5): 159–160. (In Russ.)]

10. Пумпур А.С. Роль оценки показателей общего анализа крови, биохимического анализа крови и гемостазиограммы пациентов с колоректальным раком. *Колопроктология*. 2017; (3S): 64. [Pumpur A.S. Role of the assessing the parameters of a complete blood count, biochemical blood assay and hemostasiograms in patients with colorectal cancer. *Koloproktologiya*. 2017; (3S): 64. (In Russ.)]

11. Козинец Г.И., Высоцкий В.В., Погорелов В.М. *Кровь и инфекция*. М.: Триада-фарм. 2001; 182 с. [Kozinets G.I., Vysotskiy V.V., Pogorelov V.M. *Krov' i infekciya*. (Blood and infection.) Moscow: Triada-farm. 2001; 182 p. (In Russ.)]

12. Новицкий В.В., Степовая Е.А., Гольдберг В.Е. *Эритроциты и злокачественные новообразования*. Томск. 2000; 286 с. [Novitskiy V.V., Stepovaya E.A., Gol'dberg V.E. *Eritrotsity i zlokachestvennye novoobrazovaniya*. (Erythrocytes and malignant neoplasms.) Tomsk. 2000; 286 p. (In Russ.)]

13. Плескова С.Н. *Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях*. Долгопрудный. 2011; 184 с. [Pleskova S.N. *Atomno-silovaya mikroskopiya v biologicheskikh i medicinskih issledovaniyah*. (Atomic force microscopy in biological and medical studies.) Dolgoprudnyy. 2011; 184 p. (In Russ.)]