

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДО И ПОСЛЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ

Погорелая Т. Ю., Щуров Н. Ф., Шах Ф.¹, Кебало Д. И.², Мирошникова Н. П.²,
Званцева Э. Д., Пащенко С. Н.¹, Пащенко А. С.³

Запорожский областной клинический онкологический диспансер

¹ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования» МЗ Украины

²Коммерческий реабилитационно-диагностический центр «КОМРЕЦ»

³Запорожский государственный медицинский университет

В статье представлены результаты изучения влияния химиолучевого лечения у больных раком молочной железы на структуру лимфоцитов периферической крови и показатели иммунограммы данных пациентов.

Ключевые слова: рак молочной железы, лимфоциты.

Лимфоциты играют важную роль в противоопухолевом иммунитете [6]. По размерам лимфоциты дифференцируют на три группы: узкоцитоплазменные, среднецитоплазменные и широкоцитоплазменные [3]. Большие гранулосодержащие лимфоциты являются природными киллерами [5]. Циркулирующие природные киллеры берут участие в обеспечении защиты организма от измененных собственных клеток. Широкоцитоплазменные лимфоциты часто называют «большими», диаметр их составляет 9–15 мкм [4], по другим источникам [8, 10] их размеры – 12–16 мкм. «Средние» лимфоциты имеют диаметр 10–12 мкм и составляют основной пул крови [2]. К ним относятся и В-лимфоциты, и Т-лимфоциты, активирующиеся против разных патогенов. «Малые» лимфоциты по величине равны эритроциту, иногда меньше его – 6–7 (4–8) мкм. Ядро их круглое или овальное занимает весьма значительную часть клетки. Цитоплазма видна как узкий ободок или «серп» вокруг ядра [7, 2]. Среднецитоплазменные и узкоцитоплазменные лимфоциты часто объединяют под одним общим названием «малые» лимфоциты [1]. Известно, что ядерно-цитоплазматическое соотношение отражает уровень метаболизма в клетке [9]. Поэтому оценка величины лимфоцитов, может быть использована для определения защитных возможности организма больных раком молочной железы (РМЖ).

Цель работы: изучить особенности морфологического строения лимфоцитов периферической крови у больных местнораспространенным раком молочной железы, получающих комплексное лечение.

Материалы и методы

Обследовано 210 больных РМЖ и 10 здоровых доноров. Изучены структурные особеннос-

сти лимфоцитов. Больных РМЖ разделили на две группы: 1 группа – больные с локализованными формами рака (в нее входило 30 больных) – T₁-2N₀M₀. Во второй группе больные с местнораспространенными раком молочной железы (в нее вошло 180 больных) – T₃-4N₀-3M₀. Третью группу – контрольную, составили 10 здоровых доноров. Определяли процентное соотношение «больших», «средних» и «малых» лимфоцитов, больших гранулосодержащих лимфоцитов, а также их абсолютное количество в периферической крови. Подсчет процентного соотношения лимфоцитов велся на 200 клеток. Определяли наличия антител классов IgA, IgM, IgG методом иммуноферментного анализа ИФА. Выявление Т- и В-лимфоцитов проводилось путем взаимодействия специфичных моно-клональных антител с соответствующими CD маркерами. Подсчет клеток осуществлялся с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-И2, бинокулярного микроскопа ZEISS «AXIOI MAGER». Фагоцитарная активность лейкоцитов определялась согласно способу-аналогу, с применением суточной агаровой культуры по стандарту, инкубации в термостате (37°C), окраске по Романовскому-Гимзе и подсчете общего числа поглощенных лейкоцитами микроорганизмов. Наряду с подсчетом форменных элементов в обследованных группах проводилось морфологическое исследование иммунокомпетентных клеток крови и подсчет лейкоцитарной формулы по общепринятой методике.

Для количественной оценки связи между двумя случайными величинами, в зависимости от их типа и нормальности распределения, использовались коэффициенты корреляции по Спирману. Статистическая обработка данных производилась с использованием пакета программ SPSS.

Результаты и обсуждение

Широкоцитоплазменные лимфоциты выявлялись в периферической крови и характеризовались широкой базофильной цитоплазмой, ядро содержало 1–3 нуклеолу (рис. 1). В «средних» лимфоцитах ядро превалирует над цитоплазмой. Характер хроматина грубый, есть остатки ядрышек (рис. 2). «Малые» лимфоциты по величине равны эритроциту. Ядро их круглое или слегка овальное темно-красное, с плотным хроматином, занимает большую часть клетки (рис. 3). Большие гранулярные лимфоциты выявляются в виде лимфоцитов больших размеров, с широкой цитоплазмой, в которой видны многочисленные азурофильные гранулы (рис. 4). Назначение больным химиотерапии и лучевой терапии существенно изменяет структуру лимфоцитов периферической крови. Лимфоциты периферической крови больных после проведенного комплексного лечения значительно увеличивались в размерах, в них уменьшалось ядерно-цитоплазматическое соотношение, укрупнялись, становились гиперхромными ядрышки (рис. 5).

Как видно из таблицы 1 у больных РМЖ процентное соотношении средних лимфоцитов периферической крови увеличилось в 2 раза ($p < 0,05$).

Аналогичные изменения касались и абсолютного количества ($p < 0,05$). Наблюдалась тенденция уменьшения и процентного соотношения ($p < 0,05$), и абсолютного количества ($p < 0,05$) малых и больших лимфоцитов у больных с распространенными формами РМЖ (группа 2).

Отмечалось увеличение процентного соотношения и абсолютного количества больших лимфоцитов после проведения комплексного лечения ($p < 0,05$) (табл. 2). Процентное соотношение и абсолютное количество средних ($p < 0,05$) и малых ($p < 0,05$) лимфоцитов уменьшалось после комплексного лечения.

В процентном отношении большие грануло-содержащие лимфоциты (БГЛ) у больных РМЖ увеличились почти в 2 раза в первой группе после проведения комплексного лечения ($p < 0,05$). Во второй группе увеличение в 1,5 раза ($p < 0,05$) (табл. 3).

Идентичные изменения отмечались и в оценке абсолютного количества БГЛ у больных РМЖ после комплексного лечения ($p < 0,05$). Содержание нуклеол в БГЛ увеличивалось после комплексного лечения в 1,5 раза во второй группе ($p < 0,05$) и незначительно в первой группе больных ($p < 0,05$) (табл. 4).

Установлена положительная корреляционная связь между содержанием в периферической крови малых лимфоцитов и лимфоцитов CD25 ($r = 0,37$), CD22 ($r = 0,8$). Обнаружена отрицательная корреляционная связь между содержанием малых лимфоцитов и иммуно-регуляторным индексом ($r = -0,3$), циркулирующим иммунным

комплексом ($r = -0,9$), активностью комплемента ($r = -0,83$), фагоцитарной активностью ($r = -0,5$) и фагоцитарным индексом ($r = -0,71$) (рис. 6). Выявлена отрицательная корреляционная связь между содержанием IgM ($r = -0,6$), IgA ($r = -0,1$) и содержанием средних лимфоцитов. Положительная корреляция между циркулирующим иммунным комплексом ($r = 0,8$), активностью комплемента ($r = 0,9$), фагоцитарной активностью ($r = 0,65$), фагоцитарным индексом ($r = 0,6$) и содержанием средних лимфоцитов в периферической крови (рис. 7).

Прямая корреляционная связь наблюдалась между содержанием больших лимфоцитов и лимфоцитами CD ($r = 0,3$), CD ($r = 0,3$) иммунорегулирующим комплексом ($r = 0,9$), IgG ($r = 0,82$), IgA ($r = 0,48$), IgM ($r = 0,5$), циркулирующим иммунным комплексом ($r = 0,9$), компонентом комплемента ($r = 0,85$), цитохимическим индексом ($r = 0,78$), фагоцитарной активностью ($r = 0,82$), фагоцитарным индексом ($r = 0,95$), индексом завершенности ($r = 0,9$). Отрицательная корреляционная связь установлена между большими лимфоцитами и содержанием CD22 ($r = 0,8$) (рис. 8).

Таким образом, морфологическая структура лимфоцитов связана с их фенотипом. Если в периферической крови больных РМЖ наблюдалось увеличение содержания лимфоцитов больших размеров, то одновременно отмечалось повышение лимфоцитов CD3, CD4, иммунорегулирующего комплекса, IgG, IgA, IgM, циркулирующих иммунных комплексов, компонента комплемента, цитохимического индекса; усиливалась фагоцитарная активность; увеличивался фагоцитарный индекс, индекс завершенности. При уменьшении содержания лимфоцитов больших размеров фиксировалось увеличение содержания лимфоцитов CD22. Увеличение содержания средних лимфоцитов, сопровождалось повышением содержания циркулирующего иммунного комплекса, активности комплемента, фагоцитарной активности, фагоцитарного индекса, содержание IgM, IgA уменьшалось. При увеличении содержания малых лимфоцитов фиксировалось уменьшение иммунорегуляторного индекса, циркулирующего иммунного комплекса, активности комплемента, фагоцитарной активности и фагоцитарного индекса. Снижение содержания в периферической крови малых лимфоцитов приводило к уменьшению содержания лимфоцитов CD25, С6

Выводы:

1. Установлено, что комплексное лечение больных РМЖ существенно изменяет структуру лимфоцитов периферической крови. После проведенного комплексного лечения лимфоциты периферической крови больных значительно увеличивались в размерах, в них уменьшалось ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Таблиця 1

Содержание больших, средних и малых лимфоцитов у больных РМЖ

Лимфоциты	Группа 1 T ₁₋₂ N ₀ M ₀		Группа 2 T ₃₋₄ N ₀₋₃ M ₀		Группа 3 контрольная группа	
	Относительное значение, %	Абсолютное значение, кл.×10 ⁸ /л	Относительное значение, %	Абсолютное значение, кл.×10 ⁸ /л	Относительное значение, %	Абсолютное значение, кл.×10 ⁸ /л
Большие лимфоциты	27,4±0,019*	7,2±0,02*	26,9±0,03*	6,5±0,03*	35,3 ±0,019	8,8±0,019
Средние лимфоциты	30,8±0,05*	8,0±0,018*	34,4±0,016	8,2±0,09*	14,1±0,019	3,5±0,019
Малые лимфоциты	41,6±0,019	10,9±0,015	38,9±0,018*	9,3±0,05*	50,6 ±0,020	12,7±0,019

Примечания: * – p<0,05

Таблиця 2

Содержание больших, средних и малых лимфоцитов до и после комплексного лечения у больных РМЖ

Лимфоциты	Группа 1 T ₁₋₂ N ₀ M ₀		Группа 2 T ₃₋₄ N ₀₋₃ M ₀		Группа 3 контрольная группа	
	Относительное значение, %	Абсолютное значение, кл.×10 ⁸ /л	Относительное значение, %	Абсолютное значение, кл.×10 ⁸ /л	Относительное значение, %	Абсолютное значение, кл.×10 ⁸ /л
Большие лимфоциты (до лечения)	27,4±0,049*	7,2±0,05*	26,9±0,018*	6,5±0,05	35,3±0,019	8,8±0,019
Большие лимфоциты (после лечения)	40,2±0,05*	10,5±0,05*	41,4±0,01*	9,4±0,05		
Средние лимфоциты (до лечения)	30,8±0,011*	8,0±0,028*	34,4±0,028*	8,3±0,01	14,1±0,019	3,5±0,019
Средние лимфоциты (после лечения)	27,7±0,01*	7,3±0,049*	30,6±0,046*	7,0±0,048		
Малые лимфоциты (до лечения)	41,6±0,02*	10,9±0,03*	38,9±0,019*	9,3±0,02	50,6±0,02	12,7±0,019
Малые лимфоциты (после лечения)	27,1±0,09*	7,1±0,049*	28,4±0,047*	6,5±0,048		

Примечания: * – p<0,05

Таблиця 3

Содержание больших гранулодержащих лимфоцитах у больных РМЖ

Лимфоциты	Группа 1 T ₁₋₂ N ₀ M ₀		Группа 2 T ₃₋₄ N ₀₋₃ M ₀		Группа 3 контрольная группа	
	Относительное значение, %	Абсолютное значение, кл.×10 ⁸ /л	Относительное значение, %	Абсолютное значение, кл.×10 ⁸ /л	Относительное значение, %	Абсолютное значение, кл.×10 ⁸ /л
Большие гранулодержащие лимфоциты (до лечения)	4,2±0,02*	1,3±0,01*	4,4±0,05*	1,1±0,05	3,3±0,01	1,0±0,01
Большие гранулодержащие лимфоциты (после лечения)	7,7±0,01*	2,2±0,02*	6,5±0,06*	1,8±0,01		

Примечания: * – p<0,05

Таблиця 4

Содержание нуклеол в больших гранулодержащих лимфоцитах до и после комплексного лечения

Нуклеолы	Группа 1 T ₁₋₂ N ₀ M ₀		Группа 2 T ₃₋₄ N ₀₋₃ M ₀		Группа 3 контрольная группа
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения
Нуклеолы	4,0±0,05*	4,7±0,04*	3,5±0,04*	5,1±0,045*	3,5±0,05

Примечания: * – p<0,05

2. Процентное соотношения и общее количество БГЛ после проведения химиотерапии и лучевой терапии у больных РМЖ T₁-2 N₀M₀ увеличилось почти в 2 раза, у больных РМЖ T₃-4N₀-3M₀ установлено увеличение в 1,5 раза.

3. Процентное соотношение и общее количество малых лимфоцитов до лечения прямо коррелировало с содержанием CD-25 (рецепторы ИЛ2, r=0,37) и CD-22 (В- лимфоцитов, r=0,8).

4. Наличие в периферической крови малых лимфоцитов обратно коррелировало с фагоцитарным индексом (r=-0,71), фагоцитарной активностью (r=-0,5), активностью

комплемента(r=-0,83), циркулирующим иммунным комплексом(r=-0,9).

5. Выявлена прямая корреляционная зависимость содержания больших лимфоцитов в крови с содержанием CD-3(Т-лимфоцитов, r=0,3), CD-4 (Т-хелперов, r=0,3), иммунорегулирующим комплексом (r=0,9), IgG (r=0,82), IgA (r=0,48), IgM (r=0,5), циркулирующим иммунным комплексом (r=0,9), компонентом комплемента (r=0,85), иммунорегуляторным индексом (r=0,5), цитохимическим индексом (r=0,78), фагоцитарной активностью (r=0,82), фагоцитарным индексом (r=0,95) и индексом завершенности (r=0,9).

Литература

1. Данилова Л. А. Анализы крови и мочи. – 2-е изд., перераб.и доп. – Спб., ЗАО «Салит» «Издательство Деан», 1999. – 128 с.
2. Абрамов М. Г. Гематологический атлас – М.: – 1998. – 280 с.
3. Соколова Е. И Клиническая иммунология. Руководство для врачей / Под ред. акад. РАМН Е. И. Соколова – М.: Медицина, 1998. – 272 с.
4. Петров Р. В. Иммунология – М.: Медицина, – 1987, – 416 с.
5. Стаценко Ю. В. Состояние нуклеолярного аппарата лимфоцитов крови при профессиональном воздействии металлов аллергенов и автомагнитных полей диапозона радиочастот – Автореферат – М. – 2006. – С. 1–6.
6. Казмирчук В. Е., Ковальчук Л. В. – Клиническая иммунология и аллергология Винница: НОВА КНИГА, 2006. – 526 с.
7. Вихрев Д. В. Метод свободного клеточного электрофореза лимфоцитов крови в качестве оценочного критерия. / Вихрев Д. В., Ледванов М. Ю., Стукова Н. Ю. – Пенза, С. 11.
8. Ковальчук Л. И., Мальцев Д. В., Войтюк Т. В., Сидоренко Е. И. Цитологические особенности лимфоцитов. – Инст. Иммуни и аллерг. НМИ им. А. А. Богомольца МЗ Украины, С. 1–12.
9. Hunt J. S., Petroff M. G., Mc. Intise K. P., Ober C. HLA – G and immune toberance in pregnancy // FASEB J – 2005. 19. – p. 681–693.
10. Koido S., M. Oxana and oth. – Boston, Clin. Immunol – 2004 Dec. 113(3): 261 –p. 9.

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ У ПАЦІЄНТІВ З МІСЦЕВО РОЗПОВСЮДЖЕННИМ РАКОМ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ДО- ТА ПІСЛЯ ЛІКУВАННЯ

Погоріла Т. Ю., Щуров М. Ф., Шах Ф.¹, Кебало Д. І.², Мірошнікова Н. П.², Званцева Е. Д., Пащенко С. М.¹, Пащенко А. С.³

Запорізький обласний клінічний онкологічний диспансер,¹ Запорізька медична академія післядипломної освіти,² Комерційний реабілітаційно-діагностичний центр «КОМРЕЦ»,³ Запорізький державний медичний університет

В статті представлені результати вивчення впливу хіміопроменевого лікування у хворих на рак молочної залози на структуру лімфоцитів периферичної крові і показники імунограми даних пацієнтів

Ключові слова: рак молочної залози, лімфоцити.

MORPHOLOGICAL FEATURES BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH LOCAL ADVANCED BREST CANCER BEFORE AND AFTER COMBINED TREATMENT

Pogorelaya T. Y., Shurov N. F., Shah F.¹, Kebalo D. I.², Miroshnikova N. P.², Zvanseva E. D., Pashenko S. N.¹, Pashenko A. S.³

Zaporizhzhia Regional Clinical Oncology Center,¹ Zaporizhzhia Medical Academy of Postgraduate Education,² Commerce rehabilitation and diagnostic center «KOMRETS»,³ Zaporizhzhia State Medical University

The results of studying the influence of chemoradiation therapy in patients with breast cancer on the structure of peripheral blood lymphocytes and indicators of patient data immunograms

Keywords: breast cancer, lymphocytes.

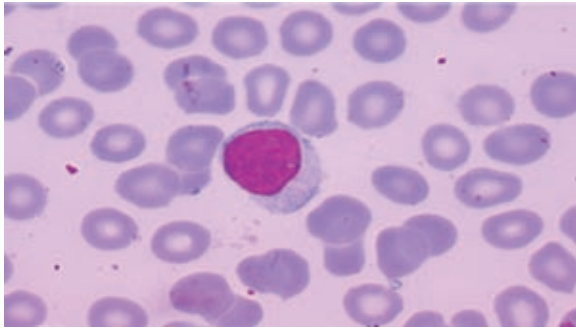


Рис. 1. Большие лимфоциты

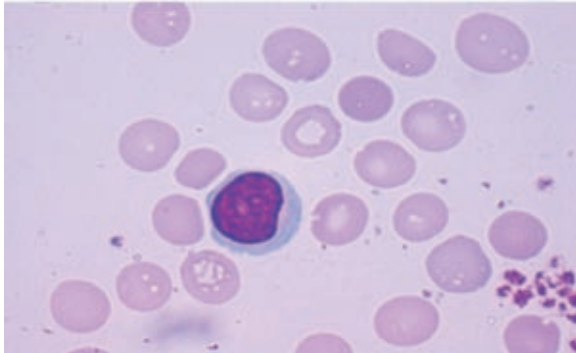


Рис. 2. Средние лимфоциты

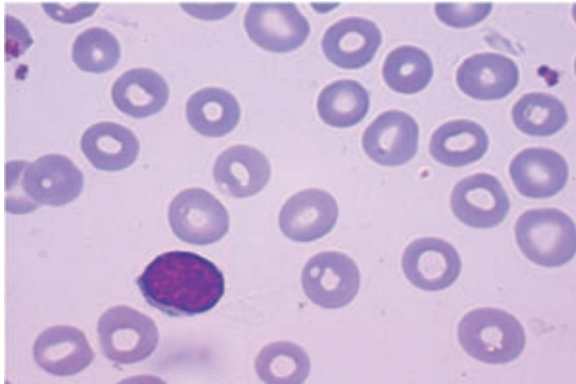


Рис. 3. Малые лимфоциты

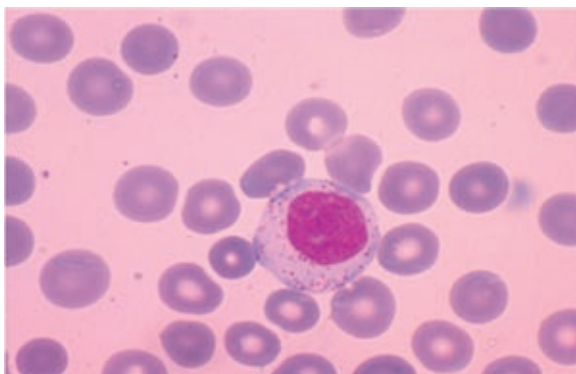


Рис. 4. Большие гранулодержащие лимфоциты

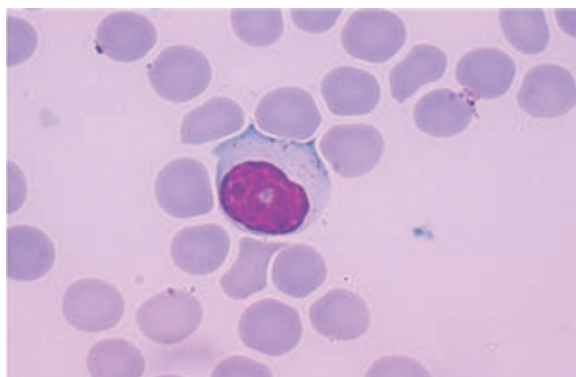


Рис. 5. Лимфоциты, после проведенного комплексного лечения

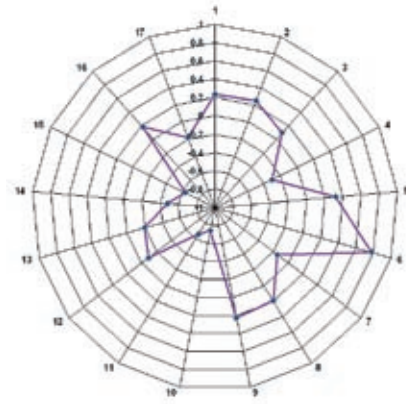


Рис. 6 Связь между содержанием малых лимфоцитов и некоторыми показателями иммунограммы.

Примечание : 1 – CD3; 2 – CD4; 3 – CD8; 4 – иммунорегулирующий комплекс; 5 – CD25; 6 – CD22; 7 – IgG; 8 – IgA; 9 – IgM; 10 – циркулирующий иммунный комплекс; 11 – активность комплемента; 12 – иммунорегуляторный индекс; 13 – цитохимический индекс; 14 – фагоцитарная активность; 15 – фагоцитарный индекс; 16 – индекс завершенности; 17 – титр.

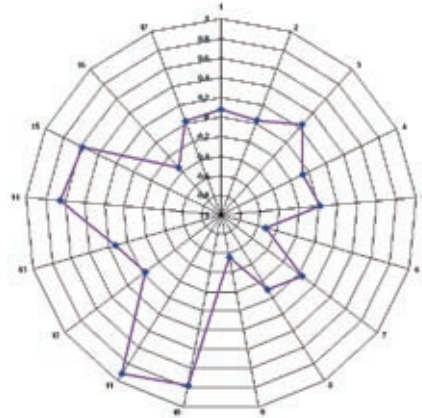


Рис. 7. Связь между содержанием средних лимфоцитов и некоторыми показателями иммунограммы:

1 – CD3; 2 – CD4; 3 – CD8; 4 – иммунорегулирующий комплекс; 5 – CD25; 6 – CD22; 7 – IgG; 8 – IgA; 9 – IgM; 10 – циркулирующий иммунный комплекс; 11 – активность комплемента; 12 – иммунорегуляторный индекс; 13 – цитохимический индекс; 14 – фагоцитарная активность; 15 – фагоцитарный индекс; 16 – индекс завершенности; 17 – титр

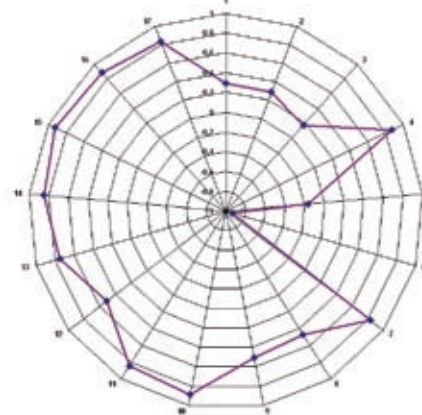


Рис. 8. Связь между содержанием больших лимфоцитов и некоторыми показателями иммунограммы:

1 – CD3; 2 – CD4; 3 – CD8; 4 – иммунорегулирующий комплекс; 5 – CD25; 6 – CD22; 7 – IgG; 8 – IgA; 9 – IgM; 10 – циркулирующий иммунный комплекс; 11 – активность комплемента; 12 – иммунорегуляторный индекс; 13 – цитохимический индекс; 14 – фагоцитарная активность; 15 – фагоцитарный индекс; 16 – индекс завершенности; 17 – титр