

АПОПТОЗ ЛЕЙКОЦИТІВ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

М. Барська^{1*}, В. Савран², Р. Стойка¹

¹Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

²Львівський державний онкологічний регіональний
лікувально-діагностичний центр
вул. Ярослава Гашека, 2А, Львів 79000, Україна,
e-mail: * barska@cellbiol.lviv.ua

Апоптоз – це специфічний процес загибелі клітин, який відбувається у фізіологічних умовах розвитку тканин та органів, а також за інволюції. Під час росту пухлини існує баланс між проліферацією та загибеллю клітин із залученням механізмів апоптозу. Апоптоз лейкоцитів крові (ЛКК) має важливу роль у забезпеченні нормального функціонування імунної системи у нормі та за умов розвитку патологічних станів різної етіології. Важливе значення у патогенезі злоякісних новоутворів, у тому числі й раку молочної залози (РМЗ), має стан імунної системи організму. Одним із найбільш перспективних напрямів сучасної онкології є вивчення ролі імунної системи у патогенезі злоякісних пухлин і можливості застосування імунологічних методів для їхньої діагностики та лікування. Досліджено лейкоцити периферичної крові пацієнтів з РМЗ до оперативного втручання, які не проходили курсу лікування. Апоптоз лейкоцитів периферичної крові у разі РМЗ визначали за апоптичним індексом (AI) цитоморфологічним методом та за вмістом фрагментованої ДНК спектрофотометричним методом. Ступінь ендогенної інтоксикації при РМЗ визначали за інтегральними гематологічними показниками та за вмістом молекул середньої маси у плазмі крові. Встановлено підвищені показники апоптозу поліморфнонуклеарних і мононуклеарних лейкоцитів периферичної крові за умов нелікованого раку молочної залози. Виявлене нами збільшення ендогенної інтоксикації дає підстави прогнозувати інтенсифікацію апоптозу лейкоцитів периферичної крові у хворих на рак молочної залози до початку терапії.

Ключові слова: апоптоз, лейкоцити крові, рак молочної залози, ендогенна інтоксикація.

Апоптоз лейкоцитів крові (ЛК) привертає увагу дослідників через його важливу роль у забезпеченні нормального функціонування імунної системи у нормі та за умов розвитку патологічних станів різної етіології [9,10,12,13]. Рак молочної залози (РМЗ) - найчастіша форма раку, що трапляється протягом життя в середньому у однієї з 11-ти жінок віком від 13 до 90 років. Численні дані літератури свідчать про те, що у більшості пацієнтів зі сформованою пухлиною, незалежно від її гістогенезу, відмічено прояв імунодефіциту, який супроводжується змінами клітинно-гуморальних показників порівняно з такими у здорових людей [1]. Досі остаточно не з'ясовані механізми імунного захисту при канцерогенезі. Пухлинні клітини не розпізнаються імунокомпетентними клітинами хворих (до яких належать ЛК) як чужорідні. Функціональний стан і біохімічні параметри ЛК формуються під впливом взаємодіючих внутрішньоклітинних, оточуючих клітину і зовнішніх факторів. Різноманітні цитокіни та стійкі імунні комплекси, що утворюються при неоплазіях, сприяють ендогенній інтоксикації організму. Зміна морфофункціональних і біохімічних характеристик ЛК під впливом токсичних метаболітів за умов пухлинного росту може

впливати на апоптоз цих клітин і віддзеркалювати інтенсивність патогенетичних змін в організмі хворих.

Методи та матеріали

Обстежено 10 нелікованих пацієнтів з РМЗ до оперативного втручання у віці від 37 до 75 років та 12 клінічно здорових донорів крові (контрольна група жіночої статі) у віці від 21 до 56 років. Кров отримували з вени з використанням гепарину як антикоагулянту (кінцеве розведення гепарину – 1:100). З цільної крові отримували лейкоконцентрат з використанням декстрану Д-500 [10]. З лейкоконцентрату виготовляли мазки, які фарбували за Романовським-Гімзою [7] і використовували для підрахунку лейкоцитарної формули та визначення морфологічних ознак апоптозу ЛК. Для розрахунку індексу апоптозу (ІА) на мазках рахували окремо поліморфонуклеарні (ПМЛ) та мононуклеарні (МНЛ) лейкоцити з ознаками апоптозу - пікноз ядра, фрагментація ядра (каріорексис), вакуолізація ядра і цитоплазми, цейозис, хроматиноліз, зменшення розмірів клітин. Сумарна кількість клітин з ознаками апоптозу становила частину загальної кількості підрахованих клітин (200 на одному мазку в різних полях зору). Апоптичний індекс (АІ) у % розраховували за формулою: $AI = (A/C) \times 100\%$, де А – кількість клітин з ознаками апоптозу; С – сума підрахованих клітин на мазку [8]. Біохімічну детекцію апоптозу проводили за визначенням вмісту фрагментованої ДНК спектрофотометричним методом при $\lambda = 595$ нм з дифеніламіновим реактивом після центрифугування лізату клітин при 15 000 об./хв для розділення інтактного хроматину (в осаді) та фрагментованої ДНК (у супернатанті) [4].

Ступінь ендогенної інтоксикації у групах порівняння оцінювали за показниками: лейкоцитарного індексу інтоксикації (ЛІІ); індексу співвідношення лейкоцитів і ШОЕ (ІЛШОЕ); вмісту молекул середньої маси (МСМ) у плазмі крові. Після проведення розрахунку лейкоцитарної формули визначали ЛІІ в умовних одиницях, у.о.: $(4 \times \text{мієлоцити} + 3 \times \text{метамієлоцити} + 2 \times \text{паличкоядерні} + \text{поліморфноядерні}) / (\text{лімфоцити} + \text{моноцити}) \times (\text{еозинофіли} + 1)$; та ІЛШОЕ у %: $\text{лімфоцити} \times \text{ШОЕ} / 100$ [5, 6]. Плазму крові отримували з аліквоти цільної гепаринізованої крові загальноприйнятним методом [3]. Вміст МСМ (%) у плазмі крові визначали спектрофотометричним методом при довжині хвиль $\lambda = 254$ та 280 нм [3].

Отримані результати обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента. Цільна периферична кров від хворих на рак молочної залози була надана співробітниками кафедри онкології та радіології факультету післядипломної освіти Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького в рамках договору про співпрацю з ІБК НАН України.

Результати і їхнє обговорення

Кількість апоптичних ПМЛ та МНЛ за показником АІ (апоптичний індекс) недостовірно змінюється на 42,9 % та 31,0 % відповідно порівняно з показниками для контрольних донорів. Одночасно з виявленням морфологічних ознак апоптозу лейкоцитів хворих на РМЗ нами проведено дослідження перебігу цього процесу за його біохімічним маркером – фрагментацією ДНК [4, 8]. Встановлено достовірно вищий вміст фрагментованої ДНК як для ПМЛ, так і для МНЛ у хворих з РМЗ відповідно на 55,1 % і 63,3 % порівняно з аналогічними показниками для здорових донорів (табл. 1). Підвищення кількості фрагментованої ДНК в мононуклеарах крові хворих може бути зумовлене наявністю компенсаторного механізму видалення антиген-специфічного клону ефекторних клітин, кількість яких збільшується у хворих на рак молочної залози [1]. У свою чергу, зростання антиген-специфічного клону ефекторних клітин виникає з підвищенням вмісту активуючих ендогенних факторів, які утворюються в надлишку за умов патології та сприяють стимуляції апоптичного процесу як у мононуклеарних, так і у поліморфонуклеарних лейкоцитах.

Встановлено, що ступінь ендогенної інтоксикації у хворих на РМЗ до хірургічного або хіміотерапевтичного лікування був вірогідно вищим, ніж у клінічно здорових донорів. Критеріями ендогенної інтоксикації слугували зміни інтегральних гематологічних показників (ЛШ та ІЛШОЕ) і рівень МСМ у плазмі крові. ЛШ та ІЛШОЕ у хворих з РМЗ були на 47,3% та 171,5% вищими відповідно, ніж у нормі (табл. 2). Така динаміка і напрям змін переконливо свідчать про наявність аутоімунної інтоксикації [5, 6]. Також суттєво вищим був рівень МСМ у плазмі крові хворих з РМЗ (табл. 2): при $\lambda = 254$ нм – на 102,4%, (при цій довжині хвилі поглинають пептиди, що не містять у своєму складі ароматичних амінокислот) та при $\lambda = 280$ нм – на 95,9%, (при цій довжині хвилі поглинають пептиди, що містять ароматичні амінокислоти).

Таблиця 1

Показники активації апоптозу лейкоцитів крові у хворих на рак молочної залози

Групи обстежених	Показники (M±m, %)			
	Апоптичний індекс		Фрагментована ДНК	
	ПМЛ	МНЛ	ПМЛ	МНЛ
Хворі на рак молочної залози, n=10	13,0 ± 2,8	3,8 ± 1,4	22,8 ± 2,3*	20,9 ± 2,1*
Здорові (донори крові), n=12	9,1 ± 2,3	2,9 ± 1,1	14,7 ± 2,0	12,8 ± 1,1

Примітка: Вірогідність відмінностей порівняно з відповідними значеннями у здорових донорів достовірна: * - $P \leq 0,05$; ПМЛ - поліморфнуклеарні лейкоцити; МНЛ - мононуклеарні лейкоцити.

Таблиця 2

Показники ендогенної інтоксикації у хворих на рак молочної залози

Групи обстежених	Показники (M±m)			
	ЛШ, у.о.	ІЛШОЕ, %	МСМ, %	
			$\lambda = 254$ нм	$\lambda = 280$ нм
Хворі на рак молочної залози, n=10	0,526 ± 0,030*	7,25 ± 0,80**	0,1344 ± 0,0190*	0,2080 ± 0,0271*
Здорові (донори крові), n=12	0,357 ± 0,026	2,67 ± 0,50	0,0664 ± 0,0115	0,1062 ± 0,0184

Примітка: Вірогідність відмінностей порівняно з відповідними значеннями у здорових донорів достовірна: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; ЛШ – лейкоцитарний індекс інтоксикації; ІЛШОЕ - індекс співвідношення лейкоцитів і ШОЕ; МСМ – молекули середньої маси.

Зростання інтегральних гематологічних показників у хворих з РМЗ відображає наявність у їхньому організмі аутоксинів, поява яких є наслідком активного запального процесу та порушення імунологічної реактивності. У ролі цих аутоксинів можуть виступати МСМ – метаболіти, серед яких багато продуктів протеолізу. Ці речовини викликають патологічні зміни на молекулярному, клітинному і системному рівнях, що має особливий прояв при запаленні й пухлинному рості. МСМ впливають на життєдіяльність всіх систем і органів, оскільки за своєю будовою дуже близькі до регуляторних пептидів [2]. Відомо, що виживання клітини або її апоптична загибель залежать від наявності проапоптичних або антиапоптичних рецепторів, а також від балансу внутрішньоклітинних посередників відповідних сигналів [8]. МСМ здатні з'єднуватись і блокувати рецептори будь-якої клітини, неадекватно впливаючи на її метаболічні функції. Основною клітинною структурою, що забезпечує реалізацію механізмів такої взаємодії, є плазматична мембрана.

Виявлений нами підвищений рівень МСМ у крові в організмі хворих з раком молочної залози може викликати порушення у функції плазматичних рецепторів лейкоцитів і, як наслідок, до інтенсифікації апоптозу лейкоцитів периферичної крові. Тому аналіз параметрів ендогенної інтоксикації хворих РМЗ дає підставу прогнозувати відхилення в інтенсивності апоптозу ЛК крові.

Отже, за умов нелікованого раку молочної залози встановлено підвищені показники апоптозу поліморфнуклеарних і мононуклеарних лейкоцитів периферичної крові. Виявлено збільшення показників ендогенної інтоксикації за інтегральними гематологічними показниками та вмістом МСМ у крові хворих із нелікованим раком молочної залози. Аналіз

параметрів ендогенної інтоксикації нелікованих хворих із РМЗ дає підставу прогнозувати прояви інтенсифікації апоптозу лейкоцитів периферичної крові до початку терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Алимходжаева Л. Т., Зиқиряходжаев А. Д. Особенности клеточных, гуморальных и активационных маркеров иммунной системы, а также биофизических параметров поверхностных мембран лимфоцитов периферической крови у больных раком молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. 2010. №1. С.17-23.
2. Карякина Е. В., Белова С. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений: обзор литературы // Клинич. лаб. диагностика. 2004. №3. С. 3–8.
3. Клінічна лабораторна діагностика. Практичні заняття з клінічної біохімії. навч. посіб. / ред. М. А. Базарнова, З. П. Гетте. К.: Вища школа, 1994. 423 с.
4. Методы исследования нуклеиновых кислот / ред. А.Н. Белозерский. М.: Мир, 1970. 277 с.
5. Могиленець О. І. Інтегральні гематологічні показники як предиктори доцільності застосування антибактеріальної терапії у хворих на гострі респіраторні інфекції // ScienceRise. 2015. №10/3(15). С. 16-19
6. Мустафина Ж. Г., Краморенко Ю. С., Кобцева В. Ю. Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией // Клинич. лаб. диагностика. 1999. №5. С. 47–49.
7. Сибірна Н. О., Великий М. М. Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові: метод. посіб. Львів: Вид-во. Львів. ун-ту, 1997. 69 с.
8. Фільченков О. О., Стойка Р. С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. Тернопіль: ТДМУ, 2006. 524 с.
9. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? //Front.Immunol. 2014. Vol. 5. article 197. P. 1-7. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00197/full>
10. Malemud C. J., Haque A., Louis N. A. et al. Immune Response and Apoptosis – Introduction // J. Clin. Cell. Immunol. 2012. S3. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9899.S3-e001>
11. Stoika R. S., Lutsik M. D., Barska M. L. In vitro studies of activation of Phagocytic cells by bioactive peptides // J. of Physiol. and Pharm. 2002. Vol. 53. №4. P. 675–688.
12. Su Z., Yang Z., Xu Y. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis // Mol. Cancer. 2015.14: 48. doi: 10.1186/s12943-015-0321-5
13. Thomas G. C. Apoptosis and cancer. The genesis of a research field //Nature Reviews. Cancer. 2009. Vol. 9. P. 501-507.

Стаття: надійшла до редакції 18.07.16
доопрацьована 30.08.16
прийнята до друку 31.08.16

АПОПТОСІС КРОВІ ЛЕЙКОЦИТІВ У ПАЦІЄНТІВ З РАКОМ МОЛОЧНОЇ ЖЕЛЕЗИ

М. Барська^{1*}, В. Савран², Р. Стойка¹

¹Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Drahomanov St., Lviv, 79005, Ukraine

²Lviv State Regional Treatment and Diagnostics Oncology Centre
2A, Yaroslav Hashek St., Lviv 79000, Ukraine

Apoptosis is a specific process of programmed cell death that normally occurs in physiological states such as tissue or organ development and involution. During tumor growth there is a balance between cell proliferation and death that involves apoptotic mechanisms. Apoptosis of blood leukocytes has an important role in normal functioning of the

immune system in healthy people and patients under pathological conditions with different etiology. The immune system has a significant role in pathogenesis of malignancies, including breast cancer. Study of the role of the immune system in pathogenesis of the malignant tumors and the possibility of applying immunological methods for diagnosis and treatment are the most promising approaches in modern oncology. Leukocytes of the peripheral blood obtained from patients with untreated breast cancer before surgery were used in our study. Apoptosis of the peripheral blood leukocytes in breast cancer patients was evaluated by the apoptosis index (AI) using cytomorphological method and spectrophotometric determination of DNA content. A degree of the endogenous intoxication at breast cancer was determined by the integral hematological parameters and the level of the middle mass molecules in blood plasma of cancer patients and healthy human donors. In this study also was found an increased apoptosis indicators in the peripheral blood polymorphonuclear and mononuclear leukocytes of patients with untreated breast cancer. It can be assumed from the revealed increase of the endogenous intoxication these patients hold the intensification of apoptosis of the peripheral blood leukocytes.

Keywords: apoptosis, blood leukocytes, breast cancer, endogenous intoxication.

АПОПТОЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М. Барская^{1*}, В. Савран², Р. Стойка¹

¹*Институт биологии клетки НАН Украины
ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Украина*

²*Львовский государственный онкологический региональный
лечебно-диагностический центр
ул. Ярослава Гашека, 2А, Львов 79000, Украина
e-mail: barska@cellbiol.lviv.ua*

Апоптоз представляет собой хорошо известный специфический процесс гибели клеток, происходящий в физиологических условиях развития тканей или органов, а также при инволюции. Во время роста опухоли существует баланс между пролиферацией и гибелью клеток с вовлечением механизмов апоптоза. Апоптоз лейкоцитов крови (ЛКК) имеет важную роль в обеспечении нормального функционирования иммунной системы в норме и в условиях развития патологических состояний разной этиологии. Существенное значение в патогенезе злокачественных новообразований, в том числе и рака молочной железы (РМЖ), имеет состояние иммунной системы организма. Одним из наиболее перспективных направлений современной онкологии является изучение роли иммунной системы в патогенезе злокачественных опухолей и возможности применения иммунологических методов для их диагностики и лечения. Исследовали лейкоциты периферической крови нелеченых пациентов с РМЖ до оперативного вмешательства. Апоптоз лейкоцитов периферической крови при РМЖ определяли по апоптическому индексу (АИ) цитоморфологическим методом и по содержанию фрагментированной ДНК спектрофотометрическим методом. Степень эндогенной интоксикации при РМЖ определяли при помощи интегральных гематологических показателей и по содержанию молекул средней массы в плазме крови. Установлены повышенные показатели апоптоза полиморфноядерных и мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у пациентов с нелеченым раком молочной железы. Выявленное увеличение эндогенной интоксикации позволяет прогнозировать интенсификацию апоптоза лейкоцитов периферической крови у этих пациентов.

Ключевые слова: апоптоз, лейкоциты крови, рак молочной железы, эндогенная интоксикация.