

Чорнобай А.В., Кайдашев І.П.

Стан апоптозу лімфоцитів периферійної крові хворих на злоякісні новоутворення прямої кишки, шийки матки та яєчників в залежності від обсягу отриманого лікування

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Вступ

Апоптоз (програмована клітинна смерть) забезпечує елімінацію з організму застарілих та змінених клітин і спостерігається в ембріогенезі, для підтримки нормального гомеостазу в організмі, при регенерації, запаленні й злоякісному рості. Апоптоз лімфоцитів, викликаний дисфункцією мітохондрій, є одним з факторів вікового зниження активності імунітету або імуностаріння [2,3]. На важливу роль при процесі апоптоза внутрішньотканинних і міжтканинних взаємодій вказує й той факт, що апоптичні тільця які утворюються при апоптозі піддаються фагоцитозу не тільки й не обов'язково спеціалізованими макрофагами, але й сусідніми з ними клітинами епітеліального або сполучнотканинного походження [2,3]. Причиною розвитку апоптоза може бути прямий вплив на геном клітини (віруси) або непрямий вплив через нейромедіатори, медіатори запалення, ішемію й т.д. Така поліетіологічність апоптозу зв'язує його з багатьма патологічними станами, такими як травма, ішемія, інфекції. У неушкодженій клітині процес апоптоза перебуває під постійним генетичним контролем. Це пов'язане з тим, що програмована клітинна загибель є необхідним процесом клітинної заміни в ембріогенезі, а в дорослої особини - механізмом природної елімінації клітин. На генетичному рівні зміни, що супроводжують апоптоз, проявляються експресією особливих генів і трансляцією відповідних білків. Відомо, принаймні, кілька генів, відповідальних за розвиток апоптоза. Серед них є як індуктори - Fas/Apo-1 (CD95), p53, так і інгібітори апоптоза - bcl-2, bcl-x, bax [3,4,5,6]. Активація виконавців апоптоза являє собою результат розгалуженого ланцюга біохімічних реакцій, зміст яких в остаточному підсумку полягає у

фрагментації ДНК і клітинній смерті. Кількість розривів у ДНК, необхідна для ініціації незворотної клітинної смерті є невеликою. Вважається, що 40 двохланцюгових розривів ДНК на клітину, тобто приблизно один розрив на хромосому, є летальним [2,3].

Особливе місце в дослідженнях взаємодії пухлина-організм займає здатність пухлин не тільки виходити із-під імунологічного контролю організму, але й активно пригнічувати захисну імунну реакцію, тим самим забезпечуючи собі імунологічну привілейованість. Імунологічна привілейованість пухлин утворюється, зокрема, завдяки здатності пухлинних клітин викликати апоптичну загибель лімфоцитів [4,5,6]. Розробка терапевтичного впливу на апоптоз у даний момент перебуває на початковому етапі, але уже зараз з'являються можливості впливу на різні етапи механізму розвитку апоптоза.

Мета роботи – вивчити рівень апоптозу лімфоцитів крові хворих на злоякісні новоутворення прямої кишки, шийки матки та яєчників в залежності від обсягу отриманого лікування.

Об'єкт та методи дослідження

В дослідження було включено 81 пацієнта, які отримували лікування в Полтавському обласному клінічному онкодиспансері з приводу раку прямої кишки (РПК) – 27 хворих (12 жінок та 15 чоловіків) віком від 47 до 65 р., раку шийки матки (РШМ) – 25 (віком від 29 до 64 р.), та раку яєчників (РЯ) – 29 хворих (віком від 48 до 61 р.). Всі досліджувані хворі мали поширені стадії новоутворень (T2-4) і отримали комбіноване та комплексне лікування. Стадії поширення процесу (за критерієм T) представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Стадії поширення пухлинного процесу

Локалізація	Стадії поширення хвороби (за критерієм T)		
	T2	T3	T4
Рак прямої кишки	3	15	9
Рак шийки матки	15	12	-
Рак яєчників	7	22	-

Хворі на РПК, як перший етап лікування, отримали неоад'ювантне лікування внутрішньовенну поліхіміотерапію (в/в ПХТ) – 7 пацієнтів та ендолімфатичну (ЕПХТ) - 7 пацієнтів, а також променеву терапію (ПТ), яка виконувалась у режимах дрібнофракційного опромінювання (2 Гр) – 6 хворих (СОД 20 - 25 Гр) та великими фракціями (5 – 7 Гр) – 7 хворих (СОД 38 - 42 Гр). Через 3 - 21 день після закінчення лікування, в залежності від лікувальної програми, всім пацієнтам виконані хірургічні втручання. Хворі на РШМ були розподілені на дві групи. Одна група хворих (14 пацієнток) на першому етапі лікування отримали курси в/в ПХТ (7) та ЕПХТ (7). Інша група (11 пацієнток) отримували тільки поєднану променеву терапію: внутрішньопорожнинно (СОД 50 Гр) та дистанційно (СОД 40 - 45 Гр). В свою чергу хворі на рак яєчника теж були розділені на дві групи: 14 хворих, які отримали ЕПХТ та 15 хворих, що отримали в/в ПХТ. Незалежно від методики уведення цитостатиків (внутрішньовенно чи ендолімфатично) всім хворим використана ідентична схема поліхіміотерапії - MPF (метотрексат, цисплатин, 5-фторурацил) у стандартних дозах [9]. Розподіл досліджуваних пацієнтів в залежності від методики лікування репрезентований у таблиці 2.

Таблиця 2.

Розподіл хворих в залежності від застосованих методик лікування.

Отримане лікування	Локалізація		
	РПК	РШМ	РЯ
ЕПХТ + хірург	7		
В/В ПХТ+хірург	7		
В/В ПХТ		7	15
ЕПХТ		7	14
Опромінення інтенсивне (5-6 Гр) +хірург	7		
Опромінення дрібнофракційне (2 Гр) +хірург	6		
Поєднана променева терапія (внутрішньопорожнинна та дистанційна)		11	

Для дослідження процесів апоптозу у пацієнтів і донорів проводили забір крові в об'ємі 3 мл з обов'язковим додаванням 0,01мл гепарину, після встановлення діагнозу (верифікації процесу) до початку та після лікувальних заходів, що проводились у випадку поліхіміо- та променевої терапії дої початку та після закінчення. А при застосуванні поєднаної променевої терапії – після закінчення внутрішньопорожнинного курсу опромінення. Дослідження проводились за наявності дозволу Комісії з етичних питань УМСА та інформованої згоди пацієнтів.

Для порівняння рівня апоптозу лімфоцитів хворих визначали рівень апоптозу лімфоцитів крові здорових донорів. Група донорів складалась з 11 осіб обох статей (6 жінок та 5 чоловіків) віком 23 – 54 роки. На момент забору крові досліджувані були обов'язково натщесерце.

Для визначення процесів апоптозу лімфоцитів використовували методики, які ґрунтовані на проточній лазерній цитометрії (ПЛЦ). Переваги використаного нами методу пов'язані з можливістю дослідження метаболізму окремо взятої клітини, а також з відносною простотою, швидкістю та точністю методу методу ПЛЦ [7,8]. Розвиток апоптозу визначали за допомогою аннексину V (AnV) який зв'язується з фосфатидилсерином, що з'являється на поверхні клітин залучених в апоптоз, а також за допомогою флюорисцентного барвника пропідіуму йодиду (PI) [10,11]. Для дослідження експресії AnV зв'язаного з фосфатидилсерином, що з'являється на поверхні клітин залучених в апоптоз, суспензію лімфоцитів периферичної крові попередньо відмивали 0,5 мл HEPES буфера (10mM HEPES/ NaOH, pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1,8mM CaCl, 1mM MgCl₂) шляхом центрифугування при 1,5 тис об/хвилину протягом 5 хвилин. До ресуспендованих клітин (10⁵) додавали 5мкл AnV-FITC („Caltag”, США) та інкубували протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Для аналізу на цитофлюориметрі до проби додавали 0,5 мл HEPES буфера. Для визначення процесів апоптозу використовували PI, до суспензії лімфоцитів за 10 хвилин до кінця інкубації з AnV додавали 10 мкл PI. Рівень апоптозу лейкоцитів (лімфоцитів) визначали, аналізуючи проби на проточному

цитофлюориметрі EPIX LX-MCL (Beckman Coulter, США) використовуючи програму System II™ Software. Для збудження флуорисценції використовували аргонний лазер з довжиною хвилі 488 нм. Додатково до флуорисцентних параметрів проводили реєстрацію прямого та бокового світлорозсіювання клітин, що дозволяло виключати з аналізу конгломерати клітин та їх уламки. Підрахунок клітин проводили протягом 300 сек, при цьому кількість проаналізованих клітин в пробі складала від 15 до 20 тис. В залежності від фаз процесу апоптозу лімфоцитів, AnV, що зв'язувався з клітиною вказував на початок апоптозу, а наявність зв'язаного AnV+PI - визначала розвинутий апоптичний процес. Кількість клітин, що вступили у ту чи іншу фазу апоптоза визначали у відсотках. Результати оброблені статистично (STATISTICA).

Результати та обговорення

Результати отримані при вивченні апоптозу у пацієнтів з новоутвореннями прямої кишки, шийки матки та яєчників, в залежності від методів терапевтичного впливу на пухлинний осередок, представленні в таблицях 3- 5.

Таблиця 3

Рівень апоптозу лімфоцитів хворих на рак прямої кишки в залежності від методів лікування (M ±σ)

Період Визначення	Рівень апоптозу лімфоцитів (%)	
	Експресія апоптозу	
	An V ⁺ (n=7)	An V+PI ⁺ (n=7)
До лікування	20,75±4,35	0,53±0,15
Після лікування: Неoad'ювантна ЕПХТ	9,22±2,12 *	0,02±0,01 *
Неoad'ювантна ПХТ в/в	9,85±3,65 *	0,06±0,02 *
Променева терапія, великими фракціями (5-7 Гр)	12,03±2,25 *	0,33±0,15
Променева терапія, дрібнофракційний курс (2 Гр)	16,67±2,15	1,29±0,35 *
Донори	3,04±0,08	0,09±0,03

Примітка. Тут та в табл. 4 та 5 - p<0,05 – порівняння показників апатозу до та після лікування. (* p<0,05)

Аналізуючи рівень апоптозу лімфоцитів хворих на РПК (таблиця 1) до лікувальних заходів та після і порівнюючи його з показниками виявленими у донорів визначається підвищення початкового рівня апоптозу (AnV^+) у 6,7 раза, а рівень кінцевої фази апоптозу ($An V+PI^+$) – у 9 раз. При дослідженні рівня апоптозу лімфоцитів в залежності від лікувальних заходів виявлено зменшення відсотку апоптозу лімфоцитів у всіх пацієнтів, що досліджувались. Найбільше зниження відсотку клітин, що мали апоптичні ознаки визначено при використанні ЕПХТ та в/в ПХТ як початкової фази ($20,75 \pm 4,35$ проти $9,22 \pm 2,12$, $p < 0,05$), так і кінцевої фази ($0,53 \pm 0,15$ проти $0,02 \pm 0,01$, $p < 0,05$). Значно менше рівень апоптозу знижався підчас променевої терапії: початковий (AnV^+) - ($20,75 \pm 4,35$ проти $16,67 \pm 2,15$, $p > 0,05$), статистична різниця не доведена. Кінцевий ($An V+PI^+$) рівень апоптозу (при застосуванні великофракційного опромінення) зменшувався не так відчутно – ($0,53 \pm 0,15$ проти $0,33 \pm 0,15$, $p > 0,05$). а при застосуванні дрібнофракційного режиму опромінення рівень апоптозу навіть збільшувався ($0,53 \pm 0,15$ проти $1,29 \pm 0,25$, $p < 0,05$).

Вивчаючи рівень апоптозу лімфоцитів у хворих на РЯ (таблиця 4) теж можна відзначити високий рівень цього показника до лікування в порівнянні з донорами (вищий у 7,8 - 14,3 рази).

Таблиця 4

Рівень експресії апоптозу лімфоцитів хворих на рак яєчників залежності від методів лікування ($M \pm \sigma$)

Період Визначення	Рівень апоптозу лімфоцитів (%)	
	Експресія апоптозу	
	An V (n=7)	An V+PI (n=7)
До лікування	$25,20 \pm 3,55$	$1,23 \pm 0,25$
Після лікування: ЕПХТ	$4,81 \pm 1,12$ *	$0,23 \pm 0,07$ *
ПХТ в/в	$5,78 \pm 1,02$ *	$0,78 \pm 0,15$ *
Донори	$3,04 \pm 0,08$	$0,09 \pm 0,03$

При застосуванні таких лікувальних заходів, як ЕПХТ та в/в ПХТ, відзначається значне зменшення (у 4,7 рази) рівня початкового (AnV^+) апоптозу

лімфоцитів та у 5,6 рази кінцевого (An V+PI⁺). Зменшення останнього при застосуванні ЕПХТ (0,23±0,07), в порівнянні з цим же показником при в/в ПХТ (0,78±0,15) більш відчутна, статистична різниця (p<0,05) доведена. Відзначає більш вагомий вплив ендолімфального уведення цитостаків на апоптоз лімфоцитів.

Розглядаючи стан апоптозу лімфоцитів у хворих на РШМ (таблиця 5) так як і при інших локалізаціях злоякісних новоутворень, що вивчалися відзначався високий рівень і початкового (AnV⁺) і кінцевого (An V+PI⁺) апоптозу (вищий від донорського відповідно у 6,8 та 12 разів). Зміни апоптотичних процесів викликані лікувальним впливом були наступні: відмічалось чітко, статистично доведене зменшення апоптозу лімфоцитів при застосуванні ЕПХТ та в/в ПХТ: до лікування початковий рівень (AnV) 20,67±3,56, після лікування 7,65±0,85, p<0,05, а також (AnV+PI⁺) - до 1,82±0,14, після - 0,09±0,03, p<0,05). При використанні поєднаної променевої терапії навпаки рівень апоптозу лімфоцитів значно підвищувався (AnV до 33,32±4,14, а AnV+PI⁺ до 2,47±0,58, p<0,05).

Таблиця 5

Рівень апоптозу лімфоцитів хворих на рак шийки матки в залежності від методів лікування (M ± σ)

Період Визначення	Рівень апоптозу лімфоцитів (%)	
	Експресія апоптозу	
	An V (n=7)	An V+PI (n=7)
До лікування	20,67±3,56	1,29±0,17
Після лікування: ЕПХТ	7,65±0,85 *	0,06±0,02 *
ПХТ в/в	9,44±1,49 *	0,07±0,01 *
Поєднана Променева терапія	33,32±4,14 *	2,47±0,58 *
Донори	3,04±0,08	0,09±0,03

За даними [1], просліджується залежність частоти апоптозу від режиму фракціювання, де показано, що відсоток клітин, що вступили у апоптоз вище при дрібному фракціюванні (1-2 Гр), ніж при середніх та високих дозах (5-12 Гр). Цей факт підтверджується і нашими дослідженнями: у хворих на РПК, які

отримували дрібнофракційне опромінювання рівень апоптозу лімфоцитів складав – $(16,67 \pm 2,15)\%$, а при опроміненні великими фракціями – $(12,03 \pm 2,25)\%$. Збільшення експресії апоптозу після променевої терапії можна пояснити так званою реакцією найближчих ефектів опромінення [1], якою є тимчасова затримка клітинного поділу (радіаційна затримка мітозів). Радіаційна затримка мітозів стосується тільки першого поділу клітин після опромінення і відрізняється від повного пригнічення мітозу, внаслідок впливу великих доз опромінення, коли клітина повністю втрачає здатність до поділу, відновленням поділу через 48 – 72 години. Найвищий рівень апоптозу лімфоцитів $(33,32 \pm 4,14)\%$ у хворих на рак шийки матки можна пояснити тим ще й тим фактом, що визначення експресії апоптозу виконувалось в момент, коли хворі отримували внутрішньопорожнинне контактне опромінення великими фракціями (5 Гр) одночасно з дрібнофракційною (2 Гр) великопольною дистанційною гама-терапією.

Висновки.

1. У хворих на РПК, РШМ, РЯ відмічається високий рівень (як початкова експресія (AnV⁺) так і кінцева (AnV - PI⁺)) апоптозу лімфоцитів, який перевищує показники здорових людей у 6 – 12 разів.
2. При застосуванні хіміотерапевтичного впливу на пухлинний осередок (незалежно від локалізації пухлини) відбувається зменшення рівня апоптозу лімфоцитів, особливо при застосуванні методики ЕПХТ.
3. Ендолімфатичне уведення цитостатиків при вираженій протипухлинній дії значно менше, ніж інші терапевтичні заходи (внутрішньовенна хіміотерапія та опромінення) викликає пошкодження здорових тканин організму, зокрема циркулюючих лімфоцитів.

УДК 616-006:615.277.3:616-097 - 618.146-006.6-085

Чорнобай А.В., Кайдашев І.П.

Стан апоптозу лімфоцитів периферійної крові хворих на злоякісні новоутворення прямої кишки, шийки матки та яєчників в залежності від обсягу отриманого лікування

Українська медична стоматологічна академія, Полтава

Резюме

Вивчений стан апоптозу лімфоцитів крові хворих на РПК, РШМ та РЯ за методикою аннексін V – пропідіум йодид за допомогою проточної лазерної цитофлуорометрії, а також залежність рівня апоптичних процесів від застосованого лікування. Встановлено, що у пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями визначених локалізацій початково високий рівень апоптозу лімфоцитів, який в 6 - 12 разів перевищує такий у здорових людей. При застосуванні хіміотерапевтичних методів лікування відзначається достовірне зменшення рівня апоптозу лімфоцитів у всіх фазах, особливо при застосуванні ЕПХТ.

Ключові слова: апоптоз лімфоцитів, рак прямої кишки, рак шийки матки, рак яєчників.

УДК 616-006:615.277.3:616-097 - 618.146-006.6-085

Чорнобай А.В., Кайдашев И.П.

Состояние апоптоза лимфоцитов периферической крови больных со злокачественными образованиями прямой кишки, шейки матки и яичников в зависимости от объёма проведенного лечения.

Резюме

Изучено состояние апоптоза лимфоцитов крови больных РПК, РШМ и РЯ по методике аннексин V – пропидиум йодид с помощью проточной лазерной цитофлуорометрии, а также зависимость уровня апоптических процессов от примененного лечения. Установлено, что у пациентов со злокачественными новообразованиями, локализаций которые изучались изначально высокий

уровень апоптоза лимфоцитов, который в 6 или 12 раз превышает такой у здоровых людей. При использовании химиотерапевтических методов лечения достоверно определяется уменьшение уровня апоптоза лимфоцитов во всех фазах, что особенно проявляется при использовании ЭПХТ.

Ключевые слова: апоптоз лимфоцитов, рак прямой кишки, рак шейки матки, рак яичников.

УДК 616-006:615.277.3:616-097 - 618.146-006.6-085

Chornobay A., Kaydashev I.

State of WBC (write blood cells) apoptosis in rectal malignancy patients, cervical and ovarian malignancy patients in with given treatment extent.

Summary

The state of apoptosis of WBC (write blood cells) in patients with rectal cancer, cervical and ovarian cancer by annexin V – propidium method with stream-line laser cytofluorometria, also was studied dependence of apoptosis process level to treatment given. It was determined that patients with certain malignancy location have primarily high apoptosis level, which is 6 - 12 times higher than norm. With chemotherapy treatment a defined decrease of apoptosis level in all phases was found, specifically with the use of endolymphatic chemotherapy.

Key words :WBC apoptosis, rectal cancer, cervical cancer, ovarian cancer.

Список літератури

1. Акимов А.А., Иванов С.Д., Хансон К.П. Апоптоз и лучевая терапия злокачественных новообразований. Вопросы онкологии. – 2003. - №3. – С.261 – 267.
2. Арулин Л.И. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения // Клиническая медицина. – 2002. - №2. – С.5-10.
3. Белушкина.Н.Н., Северин С.Е. Молекулярные основы патологии апоптоза // Архив патологии. – Т.63, №1. – С.51-60.

4. Григорьева Т.Ю., Никонова М.Ф., Ярилин А.А. Различная чувствительность к индукции апоптоза Т-лимфоцитов субкласов CD+4 и CD+8 // Иммунология. – 2002. -№4. – С.200 – 205.
5. Никонова М.Ф., Литвина М.М., Варфоломеева М.И. Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию // Иммунология. – 1999. - №2. – С.20-23.
6. Лукьянова Н.Ю., Кулик Г.И., Чехун В.Ф. Роль генов p53 и bcl -2 в апоптозе и лекарственной резистентности опухолей // Вопросы онкологии. – 2000. – Т.46, №2. – С.121-128.
7. Проточная лазерная цитометрия в оценке иммунной системы человека / Б.В.Пинегин, А.А.Ярилин, Д.В.Мазуров и др. // Журн. Микробиология. – 2002. - №6. – С.105-106.
8. Регуляція активності мембран та процесів апоптозу лімфоїдних клітин тканинними пептидами / Боброва Н.О., Весніна Л.Е., Кайдашев І.П., та ін; під редакцією Кайдашева І.П. - Полтава: Полімет, 2004. – 214с.
9. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. / Под ред. Переводчиковой Н.И. – М: Практич. Мед. – 2005. – 693с.
10. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis / G.Koopman, G.Kuijten // Blood. – 1994/ - Vol.84. – P. 1415.
11. A novel assay for apoptosis – flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptosis cells using fluorescein labelled Annexin V / I. Vermes, C. Hannen // J. Immunol. Meth. – 1995. – Vol.184. – P. 39 – 51/