

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Белевич Е.И.¹, Романчик А.М.¹, Прохорова В.И.¹, Таганович А.Д.²,
Ковганко Н.Н.²

¹Государственное учреждение «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», аг. Лесной;

²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Актуальность. Рак молочной железы (РМЖ) является одной из самых актуальных проблем в современной клинической онкологии, так как данная патология занимает лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований у женщин во многих странах мира. В Республике Беларусь по данным Белорусского канцер-регистра РМЖ занимает первое место по заболеваемости злокачественными новообразованиями у женщин (22,3%) со средним приростом за 10 лет в 26,2%. В то же время в структуре смертности от злокачественных новообразований РМЖ занимает второе место, обуславливая 15,8% смертей женщин Республики Беларусь, что свидетельствует о актуальности проблемы по улучшению результатов его диагностики и лечения [1].

Установлено, что содержание нейтрофилов в периферической крови и характер инфильтрации опухоли этими клетками могут иметь диагностическое значение при злокачественных новообразованиях различной локализации. Высокий уровень циркулирующих нейтрофилов или высокое соотношение нейтрофилов и других форм лейкоцитов ассоциируется с неблагоприятным течением онкологического заболевания [2], в том числе РМЖ [3].

Цель работы – определить диагностическую значимость измерения в крови пациенток, страдающих раком молочной железы, биохимических показателей нейтрофилов: концентрации миелопероксидазы и эластазы, а также способности клеток к дегрануляции с образованием NET-ловушек.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила цельная кровь 60 пациенток с РМЖ и 25 клинически здоровых женщин без онкологической патологии на момент обследования и в анамнезе, сопоставимые с основной группой по сопутствующим заболеваниям и возрасту.

Для определения способности нейтрофильных лейкоцитов образовывать внеклеточные ловушки использовали специфический биомаркер этого процесса – уровень гиперцитруллинированного гистона H3 (citH3), который является важным этапом в формировании NETs. Определение уровня citH3 в плазме крови пациенток основной и контрольной групп осуществляли с использованием иммуноферментного анализа (Citrullinated Histone H3 ELISA Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, США).

Дополнительно анализировали уровень внеклеточной двухцепочечной ДНК. Для этого нейтрофилы (1×10^6 клеток/мл) инкубировали с гелем HBSS (контроль) и затем стимулировали форбол-12-мирикат-13-ацетатом (ФМА) (1×10^{-7} моль/л) в течение 4 часов при 37°C. Двойные нити ДНК количественно определяли с помощью флуоресценции с использованием набора для анализа двухцепочечной ДНК Quant-iT PicoGreen в соответствии с рекомендациями производителя. Показания снимали на устройстве для считывания микропланшетов (Bio-Rad Lab).

Активность миелопероксидазы нейтрофилов (2×10^6 клеток/мл) анализировали через реакцию образования хлорноватистой кислоты, которая затем реагировала с таурином с образованием хлорамина таурина. Хлорамин таурина после взаимодействия с 5-тио-2-нитробензойной кислотой (ТНБ) образовывал бесцветный продукт – 5,5'-дитио-бис (2-нитробензойную кислоту). Одна единица активности МПО определялась как количество фермента, который гидролизует субстрат и образует таурин-хлорамин для потребления 1,0 мкмоль ТНБ в минуту при 25°C. Определение проводили путем измерения оптической плотности образца при 460 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов (Bio-Rad Lab).

Активность нейтрофильной эластазы анализировали после обработки суспензии нейтрофилов (2×10^6 клеток/мл) N-формилметионин-лейцилфенилаланином (fMLP; 1×10^{-7} моль/л, 100 мкл) в течение 30 минут при 37°C. Через 30 минут измеряли оптическую плотность образовавшегося п-нитроанилина при 405 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов (Bio-Rad Lab).

О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчета диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС), предсказательной ценности положительного (ПЦПР) и отрицательного результатов (ПЦОР) и диагностической эффективности (ДЭ) теста.

Результаты и обсуждение. Выявлены значимые различия ($p < 0,05$) между группой пациентов и группой здоровых людей в отношении уровня гиперцитруллинированного гистона citH3 (таблица 1).

Таблица 1 – Уровень показателей в крови пациентов с РМЖ и здоровых людей

Показатель	Группа здоровых людей	Пациентки с РМЖ	p
Цитруллированный гистон H3 (citH3), нг/мл	0,326 [0,281; 0,371]	0,746 [0,361; 0,859]	0,037
Внеклеточная ДНК, нг/мл	147,1 [111,3; 168,2]	193,7 [163,6; 223,5]	0,022
Активность миелопероксидазы, мU/мл	3,9 [1,5; 5,5]	7,1 [2,9; 9,3]	0,008
Активность нейтрофильной эластазы, мU/мл	2,7 [1,1; 3,9]	4,9 [2,8; 6,3]	0,012

Дополнительным критерием, подтверждающим увеличенную способность нейтрофилов у пациентов с РМЖ к формированию NET-ловушек, является уровень внеклеточной ДНК, который оказался выше в сравнении с группой здоровых лиц. Анализ активности секреторных ферментов нейтрофилов – миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы также показал статистически значимое увеличение в случае пациентов с РМЖ в сравнении со здоровыми людьми. Результаты определения диагностической информативности анализируемых показателей показали их перспективность использования в клинической практике (таблица 2).

Таблица 2 – Диагностическая информативность показателей при РМЖ

Показатель	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	ДЭ
Цитруллированный гистон H3 (citH3), нг/мл	0,573	73,2	79,7	45,4	90,1	76,2
Внеклеточная ДНК, нг/мл	0,171	63,7	69,9	35,4	87,6	66,3
Активность миелопероксидазы, мU/мл	4,9	57,3	72,3	35,9	87,3	69,1
Активность нейтрофильной эластазы, мU/мл	3,5	82,1	85,3	57,8	93,2	83,7

Примечание: ПЗ – пороговое значение; ДЧ, ДС, ДЭ – диагностические чувствительность, специфичность и эффективность, соответственно; ПЦПР и ПЦОР – прогностическая ценность положительного и отрицательного результата, соответственно.

Выводы: биохимические маркеры нейтрофилов обладают высокой диагностической информативностью при РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных Белорусского канцер-регистра за 2010-2019 гг. / А. Е. Океанов [и др.]; под ред. С. Л. Полякова. – Минск: РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова, 2020. – 298 с.
2. Hedrick, C. C., Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted / C.C. Hedrick, I. Malanchi // Nat. Rev. Immunol. 2022. – Vol. 22, № 3 – P. 173–187.
3. Xiong, S. Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis /S. Xiong, L. Dong, L. Cheng //J. Hematol. Oncol. 2021. – Vol. 14, № 1 – P. 173–195.

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ОБЩЕЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ - 2024**

*Материалы республиканской
научно-практической конференции*

24 мая 2024 года

Гродно
ГрГМУ
2024