

© КУРТАСОВА Л. М., СЕМЁНОВ Э. В., ЗУКОВ Р. А., ШКАПОВА Е. А.

УДК 616.62-006.6:616.155.34

ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА И ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Л. М. Куртасова¹, Э. В. Семёнов¹, Р. А. Зуков¹, Е. А. Шкапова²

¹ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, ректор — д. м. н., проф. И. П. Артюхов; кафедра клинической иммунологии, зав. — д. м. н., проф. Н. И. Камзалакова; кафедра онкологии и лучевой терапии с курсом ПО, зав. — к. м. н., доцент Р. А. Зуков; ²КГБУЗ Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А. И. Крыжановского, гл. врач — к. м. н. А. А. Модестов.

Цель исследования. Изучение количественных показателей, параметров фагоцитарной активности и хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (РМП) до хирургического лечения.

Материалы и методы. Обследовано 44 больных мышечно-инвазивным РМП в возрасте 45-55 лет. Контрольную группу составили 39 здоровых доноров. Для определения фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа проводили тесты с частицами латекса и культурой *S. epidermidis*. Оценку люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов проводили по методу De Sole et al. (1983).

Результаты. У больных мышечно-инвазивным РМП выявлено повышение процентного содержания и абсолютного числа нейтрофилов в периферической крови, установлены изменения фагоцитарной активности и хемилюминесцентного ответа.

Заключение. Обнаруженные изменения отражают функционально-метаболическое напряжение нейтрофильных гранулоцитов у больных мышечно-инвазивным РМП.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, мышечно-инвазивный, фагоцитоз, хемилюминесценция.

CHANGING OF THE QUANTITY AND FUNCTIONAL-METABOLIC ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER

L. M. Kurtasova¹, E. V. Semenov¹, R. A. Zukov¹, E. A. Shkapova²

¹Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V. F. Voyno-Yasenetsky

²Krasnoyarsk Regional Clinical Oncological Center.

The aim of the research. To study the quantitative indicators, parameters of phagocytic activity and chemiluminescence response of peripheral blood neutrophils in patients with muscle-invasive bladder cancer before surgical treatment.

Materials and methods. The study involved 44 patients with muscle-invasive bladder cancer at the age of 45-55 years old. Control group was consisted of 39 healthy donors. To determine the phagocytic index and phagocytic number were carried out the tests with latex particles and *S. epidermidis* culture. The assessment of luminol - dependent chemiluminescence (ChL) of neutrophils was carried out by the method De Sole et al. (1983).

Results. In patients with muscle-invasive bladder cancer was detected the increase of percentage and absolute number of neutrophils in the peripheral blood, were found phagocytic activity changes and the chemiluminescent response.

Conclusion. The observed changes reflect the functional-metabolic stress of neutrophilic granulocytes in patients with muscle-invasive bladder cancer.

Key words: bladder cancer, muscle-invasive, phagocytosis, chemiluminescence.

Введение

Ежегодно в мире регистрируется более 356 тыс. новых случаев рака мочевого пузыря (РМП), из которых около 30% составляют пациенты с мышечно-инвазивными формами заболевания [1]. В России в 2012 году было впервые выявлено 14 212 случаев РМП, стандартизированный показатель заболеваемости составил $5,80 \pm 0,05$ на 100 тыс.

населения, в Красноярском крае диагностировано 278 случаев заболевания, что составило $6,27 \pm 0,05$ на 100 тыс. населения [2].

В последнее время к эффекторным клеткам системы естественной противоопухолевой резистентности наряду с макрофагами и естественными киллерами относят полиморфноядерные гранулоциты, способные оказывать

деструктивные воздействия на опухолевые клетки-мишени. Многие авторы описывают значительное увеличение абсолютного количества нейтрофилов у опухоленосителей как в эксперименте, так и в клинике. Ответственным за нейтрофилию, по-видимому, является колониестимулирующий фактор, продуцируемый опухолевыми клетками [3,4].

При злокачественных новообразованиях часто происходит изменение хемотаксической активности нейтрофилов, обусловленное продукцией низкомолекулярных факторов опухолевого происхождения, которые непосредственно действуют на клетки, в частности на их рецепторный аппарат. С нарушением рецепторного аппарата тесным образом может быть связано изменение окислительного метаболизма нейтрофилов у больных злокачественными новообразованиями, описанное рядом исследователей. Следует отметить, что цитопатическое действие нейтрофилов в основном связано с генерацией активных форм кислорода [5,6,8,9,10].

Все вышеизложенное обуславливает актуальность исследования структурно-функциональных изменений нейтрофильных гранулоцитов при различных формах злокачественного роста.

Целью настоящего исследования являлось изучение количественных показателей, параметров фагоцитарной активности и хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря до хирургического лечения.

Материалы и методы

На базе урологического отделения Красноярского краевого клинического онкологического диспансера имени А.И. Крыжановского обследовано 44 пациента мышечно-инвазивным ($T_{2-3}N_0M_0$) раком мочевого пузыря до хирургического лечения в возрасте 45-55 лет.

Контрольную группу составили 39 здоровых доноров аналогичного возраста.

Количество лейкоцитов периферической крови определялось в камере Горяева. Для учета количества нейтрофилов в периферической крови производили подсчет лейкоцитарной формулы (мазок с окраской по Романовскому - Гимзе).

Для определения фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ) проводили тесты с частицами латекса и культурой *S. epidermidis* ($1500 \cdot 10^6$ кл/мл, по стандарту мутности MC Farland, Bio Merieux, Франция).

Оценку люминол-зависимой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов крови проводили по методу De Sole et al. [7] на биохемилюминесцентом анализаторе «CL 3606» (Россия).

Определяли следующие параметры: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение (I_{max}), и площадь под хемилюминесцентной кривой (S). В качестве индуктора «дыхательного взрыва» использовали опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл («Sigma», США). Усиление ХЛ, индуцированной зимозаном, относительно спонтанной ХЛ оценивали соотношением $S_{зимозан} / S_{спонтанная}$ и определяли как индекс активизации.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA v. 8.0» (StatSoft, Inc., США). Статистическую значимость исследуемых показателей в независимых выборках анализировали с помощью критерия Манна-Уитни. Для выборок с попарно связанными вариантами использовали критерий Вилкоксона. Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала, где C_{25} -25 перцентиль, C_{75} -75 перцентиль.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных исследований выявлено статистически значимое увеличение количества лейкоцитов, повышение процентного содержания и абсолютного числа палочко- и сегментоядерных нейтрофилов периферической крови у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (табл. 1).

Таблица 1

Количество лейкоцитов и нейтрофилов в периферической крови у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (Me; C_{25} - C_{75})

Показатель	Контрольная группа (n = 39)	Больные РМП (n = 44)
Лейкоциты, $10^9/л$	5,00 4,00 – 6,30	8,45 7,13 – 10,55 $p < 0,0001$
Палочкоядерные нейтрофилы, %	4,00 2,00 – 4,00	6,00 4,00 – 9,00 $p < 0,0001$
Палочкоядерные нейтрофилы, $10^9/л$	0,14 0,10 – 0,14	0,67 0,32 – 0,88 $p < 0,0001$
Сегментоядерные нейтрофилы, %	57,00 52,00 – 65,00	63,00 55,00 – 71,00 $p < 0,05$
Сегментоядерные нейтрофилы, $10^9/л$	3,11 2,86 – 3,78	5,44 4,35 – 7,25 $p < 0,05$

Примечание: p – статистически значимые различия с показателями контрольной группы.

При этом количество активно фагоцитирующих нейтрофилов и их поглотительная способность не имели статистически значимых различий с показателями контрольной группы (табл. 2).

При исследовании показателей фагоцитарной активности в зависимости от вида объекта фагоцитоза установлено, что у больных мышечно-инвазивным РМП количество активно фагоцитирующих *S. epidermidis* нейтрофилов крови превышает количество клеток, вступающих в реакцию фагоцитоза с частицами латекса. Однако поглотительная способность нейтрофилов крови в данном случае не зависит от объекта фагоцитоза, поскольку статистически значимых различий в сравниваемых группах не выявлено (табл. 3).

Таблица 2

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (Me; C₂₅-C₇₅)

Показатель		Контрольная группа (n = 39)	Больные РМП (n = 44)
ФИ	Культура <i>S. epidermidis</i> , %	60,00 30,00 – 75,00	43,00 16,00 – 75,00
	Частицы латекса, %	35,00 22,00 – 44,00	28,50 16,00 – 56,00
ФЧ	Культура <i>S. epidermidis</i> , о. е.	5,75 2,75 – 9,50	4,30 2,75 – 8,80
	Частицы латекса, о. е.	5,50 2,00 – 10,50	6,00 2,83 – 10,20

Примечание: ФИ – фагоцитарный индекс; ФЧ – фагоцитарное число.

Таблица 3

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов крови в зависимости от объекта фагоцитоза (Me; C₂₅-C₇₅)

Показатель	Культура <i>S. epidermidis</i>	Частицы латекса
Контрольная группа (n = 39)		
ФИ, %	60,00 30,00 – 75,00	35,00 22,00 – 44,00
ФЧ, о. е.	5,75 2,75 – 9,50	5,50 2,00 – 10,50
Больные РМП (n = 44)		
ФИ, %	43,00 16,00 – 75,00	28,50 16,00 – 56,00 p<0,01
ФЧ, о. е.	4,30 2,75 – 8,80	6,00 2,83 – 10,20

Примечание: p – статистически значимые различия с показателями *S. epidermidis*.

Изучение параметров хемилюминесцентного ответа у больных мышечно-инвазивным РМП выявило увеличение площади под спонтанной хемилюминесцентной кривой относительно соответствующего показателя в группе контроля (табл. 4).

Таблица 4

Показатели хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (Me; C₂₅-C₇₅)

Показатель	Контрольная группа (n = 39)	Больные РМП (n = 44)
Спонтанная хемилюминесценция		
Tmax, с	578,00 277,00 – 1530,00	1759,50 704,00 – 2148,00
I _{max} , о. е. * 10 ³	6,36 3,00 – 15,88	7,40 2,99 – 17,13
S ₁ , о. е. * 10 ⁵	1,98 1,23 – 4,13	2,58 0,85 – 12,45 p<0,05
Индукцированная хемилюминесценция		
Tmax, с	1270,00 896,50 – 1779,00	1955,00 1431,00 – 2105,00 p<0,05
I _{max} , о. е. * 10 ³	9,86 4,98 – 36,65	22,46 17,11 – 42,77 p<0,05
S ₂ , о. е. * 10 ⁵	3,28 1,52 – 9,28	7,71 3,31 – 22,20 p<0,05
S ₂ /S ₁ , о. е.	1,87 1,38 – 3,10	3,25 2,27 – 4,73

Примечание: p – статистически значимые различия с показателями контрольной группы.

Оценка показателей зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови позволила обнаружить удлинение времени реагирования на стимул, повышение в 2,28 раза (p<0,05) интенсивности свечения и увеличение в 2,35 раза (p<0,05) площади под стимулированной хемилюминесцентной кривой по сравнению с параметрами контрольной группы (табл. 4).

Необходимо отметить, что индекс активации не имел статистически значимых различий с контрольными величинами. Это свидетельствует о сохранении компенсаторных метаболических возможностей нейтрофильных гранулоцитов крови у больных мышечно-инвазивным РМП.

Заключение

В результате проведенного исследования установлено увеличение у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря процентного содержания и абсолютного количества палочко- и сегментоядерных нейтрофилов в периферической крови. Сохранение в пределах физиологической нормы количества активно фагоцитирующих нейтрофилов и их поглотительной способности.

У больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря наблюдается высокая интенсивность кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови, с которым напрямую связан цитопатический эффект данной клеточной популяции. Это отражает функционально-метаболическое напряжение нейтрофильных гранулоцитов периферической крови у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря.

Литература

1. Заболотнева А.А., Гайфуллин Н.М., Буздин А.А., Алексеев Б.Я., Андреева Ю.Ю., Шегай П.В., Соков Д.Г., Русаков И.Г. Молекулярные маркеры рака мочевого пузыря: от частного к целому // Онкоурология. — 2011. — № 3. — С. 16-19.
2. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. — М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2014. — 250 с.
3. Мальцева В.Н., Авхачева Н.В., Сафронова В.Г. Общие закономерности в изменении функциональной активности нейтрофилов при росте *in vivo* опухолей разной иммуногенности // Иммунология. — 2009. — № 2. — С. 116-119.
4. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евглевский А.А. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты // Иммунология. — 2012. — № 5. — С. 281-287.
5. Савченко А.А., Дресвянкина Л.В., Гринштейн Ю.И., Аристов А.И. Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофилов крови у больных внебольничной пневмонией в динамике лечения // Сибирское медицинское обозрение. — 2014. — № 5. — С. 52-57.
6. Chen G., Dimitriou I., Milne L., Lang P.A., Fine N., Ohashi P.S., Kubes P., Rottaped R. The 3BP2 adapter protein is required for chemoattractant-mediated neutrophil activation // J. Immunol. — 2012. — Vol. 189, № 5. — P. 2138-2150.
7. De Sole P., Lippa S., Lixxarru G.. Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to access oxygen – dependent microbial activity of granulocytes // J. Clin. Lab. Autom. — 1983 — Vol. 3. — P. 391-400.
8. Marcoux J., Man P., Petit-Haertlein., Vives C., Forest E., Fieschi F. P47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, № 37. — P. 28980-28990.
9. Oakes P.W., Patel D.C., Morin N.A., Zitterbart D.P., Fabry B., Reichner J.S., Tang J.X. Neutrophil morphology and migration are affected by substrate elasticity // Blood. — 2009. — Vol. 114, № 7. — P. 1387-1395.
10. Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R. Neutrophil kinetics in health and disease // Trends Immunol. — 2010. — Vol. 31, № 8. — P. 318-324.

References

1. Zabolotneva A.A., Gaifullin N.M., Buzdin A.A., Alekseev B. Ya., Andreeva Yu. Yu., Shegay P.V., Sokov D.G., Rusakov I.G.

Molecular markers for urinary bladder cancer: from the private to the whole // Oncourology. — 2011. — № 3. — P. 16-19.

2. Malignant neoplasms in Russia in 2012 (morbidity and mortality) / Ed. A.D. Caprina, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. — M.: FGBI «MNIIOI named after P.A. Herzen» Russian Ministry of Health, 2014. — P. 250.

3. Maltseva V.N., Avkhacheva N.V., Safronova V.G. Common regularities in the change of the functional activity of neutrophils during the growth of tumors *in vivo* of different immunogenicity // Immunology. — 2009. — № 2. — P. 116-119.

4. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Yevglevskiy A.A. The dual role of neutrophilic granulocytes in the realization of anti-tumor protection // Immunology. — 2012. — № 5. — P. 281-287.

5. Savchenko A.A., Dresvyankina L.V., Grinshtein Yu.I., Aristov A.I. Features of chemiluminescent activity of blood neutrophils in patients with community-acquired pneumonia during the treatment // Siberian Medical Review. — 2014. — № 5. — P. 52-57.

6. Chen G., Dimitriou I., Milne L., Lang P.A., Fine N., Ohashi P.S., Kubes P., Rottaped R. The 3BP2 adapter protein is required for chemoattractant-mediated neutrophil activation // J. Immunol. — 2012. — Vol. 189, № 5. — P. 2138-2150.

7. De Sole P., Lippa S., Lixxarru G.. Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to access oxygen – dependent microbial activity of granulocytes // J. Clin. Lab. Autom. — 1983 — Vol. 3. — P. 391-400.

8. Marcoux J., Man P., Petit-Haertlein., Vives C., Forest E., Fieschi F. P47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, № 37. — P. 28980-28990.

9. Oakes P.W., Patel D.C., Morin N.A., Zitterbart D.P., Fabry B., Reichner J.S., Tang J.X. Neutrophil morphology and migration are affected by substrate elasticity // Blood. — 2009. — Vol. 114, № 7. — P. 1387-1395.

10. Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R. Neutrophil kinetics in health and disease // Trends Immunol. — 2010. — Vol. 31, № 8. — P. 318-324.

Сведения об авторах

Куртасова Людмила Михайловна – доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, г.1; тел. 8(391) 2200628; e-mail: sibmed-obozrenie@yandex.ru.

Семёнов Эдуард Васильевич – аспирант кафедры онкологии и лучевой терапии с курсом ПО, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка г.1; тел. 8(391) 2224026; e-mail: edik1188@mail.ru.

Зуков Руслан Александрович – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой онкологии и лучевой терапии с курсом ПО, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка г.1; тел. 8(391) 2224026; e-mail: zukov.ra@krasgmu.ru.

Шкапова Екатерина Алексеевна – кандидат биологических наук, биолог клинико-диагностической лаборатории, КГБУЗ Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А. И. Крыжановского.

Адрес: 660133, г. Красноярск, 1-я Смоленская 16; тел. 8(391)2224061; e-mail: k_shkapova@mail.ru.