

УДК 571.27

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

И.И. Гвоздев

Установлены особенности продукции активных форм кислорода нейтрофилами больных раком мочевого пузыря. При раке мочевого пузыря в нейтрофилах наблюдается снижение продукции супероксид-анион радикала относительно контрольной группы, статистически значимых отличий в продукции вторичных активных форм кислорода не выявлено.

***Ключевые слова:** активные формы кислорода; нейтрофильные гранулоциты; рак мочевого пузыря*

FEATURES OF THE SYNTHESIS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER

I.I. Gvozdev

The features of the production of reactive oxygen species by neutrophils in patients with bladder cancer have been established. In bladder cancer, there is a decrease in the production of superoxide anion radical in neutrophils relative to the control group; no statistically significant differences in the production of secondary reactive oxygen species were found.

***Keywords:** reactive oxygen species; neutrophilic granulocytes; bladder cancer*

Рак мочевого пузыря представляет собой тяжелое, иногда приводящее к инвалидности, онкоурологическое заболевание, которое не имеет своей разработанной системы активного выявления. Изучение патогенеза рака мочевого пузыря является чрезвычайно актуальным, поскольку происходит неуклонный рост больных данным

видом рака [1]. Нарушения иммунной системы играют ведущую роль в развитии данного онкоурологического заболевания. Наиболее реактивными и многочисленными клетками этой системы являются нейтрофильные гранулоциты [2]. Нейтрофильные гранулоциты представляют собой высокореактивное звено в иммунной системе. Воспринимая многочисленные сигналы о дестабилизации внутренней среды, нейтрофилы модулируют свои функции, нацеленные на её восстановление. Активированные нейтрофилы сами становятся мощными эффекторами пусковых и регуляторных механизмов каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления. Хемилюминесцентная активность характеризует состояние «респираторного взрыва» нейтрофильных гранулоцитов, который развивается при взаимодействии клеток с объектами фагоцитоза [2,3]. В связи с этим изучение активности респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов позволит на клеточном уровне охарактеризовать особенности генеза воспалительных процессов при РМП.

Объектом исследования стали нейтрофилы крови больных РМП (рак мочевого пузыря). На базе Красноярского краевого онкологического диспансера им. А. И. Крыжановского г. Красноярска обследовано 27 пациентов с РМП, в возрасте 30–65 лет (средний возраст пациентов составил $49,6 \pm 9,4$ лет). В контрольную группу входит 35 человек аналогичного возрастного диапазона. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина: $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ – для отделения лимфоцитов; $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$ – для выделения нейтрофилов. Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 20 мкл донорской сыворотки АВ (IV)Rh (-), 50 мкл люминола или люцигенина («Sigma», США) в концентрации 10–5 М, 40 мкл опсонизиро-

ванного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 200 мкл взвеси нейтрофилов (2 млн/мл) и 240 мкл раствора Хэнкса («ПанЭко», Россия) для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хэнкса – для индуцированной [3]. Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3606» (СКТБ «Наука», Красноярск). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали по отношению площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной ($S_{инд.}/S_{спонт.}$) и определяли как индекс активации. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoftInc., 2007). Описание выборки производили с помощью подсчёта медианы и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

В ходе исследования показателей спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у больных регистрируется снижение времени выхода на максимум, а также величин максимума интенсивности и площади под кривой люминесценции. В ходе исследования показателей зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у больных РМП регистрируется снижение времени выхода на максимум, а также величин максимума интенсивности и площади под кривой люминесценции. В ходе исследования люминол-зависимой хемилюминесценции статистически значимых отличий контрольной и опытной групп выявлено не было.

Синтез активных форм кислорода характеризует активность метаболических процессов и резервы нейтрофильных гранулоцитов. Доказано, что люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, определяющегося как первичная активная форма кислорода, и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы [2]. Отсюда следует, что исследование люцигенин-зависи-

мой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов позволяет охарактеризовать состояние активности НАДФН-оксидазы в нейтрофилах. Выяснено, что у больных РМП наблюдается снижение уровня синтеза супероксид-радикала нейтрофилами.

Таблица 1.

Люцигенин-зависимая хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных РМП (Ме, C_{25} – C_{75})

Показатели	Контроль, n = 35		РМП, n = 27		p
	Ме	C_{25} - C_{75}	Ме	C_{25} - C_{75}	
Спонтанная хемилюминесценция					
T_{max} , сек.	2103	1435 - 2904	1154	612 - 1808	<0,001
I_{max} , о.е.	7947	2865 - 16632	1223	261 - 3756	<0,001
S , о.е. × сек.	15488913	3990118 - 42120000	3203500	723500 - 12740000	<0,001
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция					
T_{max} , сек.	1738	1389 - 2342	1224	969 - 1514	<0,001
I_{max} , о.е.	14157	7586 - 29292	4683	1415 - 7744	<0,001
S , о.е. × сек.	25464208	10700771 - 65539501	12605000	3274000 - 26250000	
ИА ($S_{инд} / S_{спонт}$)	2	1,2 - 3	2	1 - 5,7	

Уровень продукции супероксид-радикала как в состоянии относительного покоя, так и при дополнительной антигенной стимуляции снижается относительно контрольных значений. Скорость развития реакции также замедляется.

Таким образом, в ходе исследования установлены некоторые особенности генерации активных форм кислорода нейтрофилами крови у больных раком мочевого пузыря. Наблюдается снижение уровня синтеза супероксид-радикала (наиболее активная форма кислорода) нейтрофилами, которые пребывают в состоянии относительного покоя. В результате индукции «респираторного взрыва» зимозаном уровень активности НАДФН-оксидазы повышается, однако у больных раком мочевого пузыря данный уровень всё равно ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствует о некотором истощении метаболических резервов нейтрофилов. Поскольку аналогичного снижения продукции вторичных активных форм кислорода выявлено не было, интенсивность «респираторного взрыва» нейтрофилов, вероятно определяется, в основном,

уровнем продукции вторичных активных форм кислорода. Поскольку посредством хемилюминесцентной реакции было выявлено снижение уровня синтеза супероксид-радикала и отсутствие достоверного увеличения синтеза вторичных активных форм кислорода, можно сделать вывод, что при раке мочевого пузыря наблюдается снижение активности врожденного иммунитета, выраженное ингибированием НАДФН-оксидазы нейтрофилов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Wang G. Urinary Bladder Pathology: World Health Organization Classification and American Joint Committee on Cancer Staging Update / Wang, G. and McKenney, J. K. // Arch. Pathol. Lab. Med. 2019. vol. 143. No. 5. P. 571 – 577
2. Савченко А.А. Фагоцитарная и хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови у больных раком мочевого пузыря/ Савченко А.А., Зуков Р.А., Фирсов М.А., Слепов Е.В., Беленюк В.Д., Гвоздев И.И., Борисов А.Г.// Российский онкологический журнал. 2021. Т. 26. № 2. С. 39-48.
3. Савченко А.А Особенности фагоцитарной активности и состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода/Савченко А.А., Гвоздев И.И., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Мошев А.В.//Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7. № 1. С. 51-60.
4. Черданцев Д.В. Концепция комплексного подхода в ведении пациентов с тяжелыми формами распространенного гнойного перитонита / Д.В. Черданцев, О.В. Первова, В.А. Шапкина [и др.]// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 12-3. С. 498-503. – EDN XENYNH.
5. Борисов А.Г. Изменение фенотипа клеток врожденного иммунитета у больных с политравмой в динамике использования вакцины для профилактики синегнойной палочки / А.Г. Борисов, А.А. Савченко, И.В. Кудрявцев [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2016. Т. 21. № 3. С. 124-129. EDN WBGJGZ.

6. Савченко А.А. Изменение субпопуляционного состава и фагоцитарной активности моноцитов у больных раком почки при воздействии метаболитов *in vitro* / А.А. Савченко, А.Г. Борисов, В.Д. Беленюк, А.В. Мошев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 171. № 3. С. 344-348. EDN DXFMLM.
7. Беленюк В.Д. Особенности фенотипа В-лимфоцитов крови в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита / В.Д. Беленюк, А.А. Савченко, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11. № 3. С. 454-462. EDN YINYGC.
8. Savchenko A.A. TREC/KREC Levels and T and B Lymphocyte Subpopulations in COVID-19 Patients at Different Stages of the Disease / A.A. Savchenko, V. Beleniuk, A. Borisov [et al.] // Viruses. 2022. Vol. 14. No 3. P. 646. EDN OFHFVJ.
9. Савченко А.А. Фенотип НК-клеток в динамике послеоперационного периода у больных перитонитом в зависимости от исхода заболевания / А.А. Савченко, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, В.Д. Беленюк // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9. № 3-4. С. 539-548. EDN ZLVPCT.
10. Савченко А.А. Регуляторное влияние моноцитов крови на популяционный состав гранулоцитарных лейкоцитов и состояние их респираторного взрыва при распространенном гнойном перитоните / А.А. Савченко, А.Г. Борисов, Д.В. Черданцев, О.В. Первова и др. Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8. № 2. С. 201-210.

References

1. Wang G., McKenney J.K. Urinary Bladder Pathology: World Health Organization Classification and American Joint Committee on Cancer Staging Update. Arch. Pathol. Lab. Med. 2019. Vol. 143. No. 5. P. 571-577.
2. Savchenko A.A., Zukov R.A., Firsov M.A., Slepov E.V., Belenyuk V.D., Gvozdev I.I., Borisov A.G. Fagotsitarnaya i khemilyuminescentnaya aktivnost' neytrofilov krovi u bol'nykh rakom mochevogo puzyrya [Phagocytic and chemiluminescent activity of blood neutrophils in patients with bladder cancer]. Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal [Russian Journal of Oncology]. 2021. Т. 26. № 2. S. 39-48.
3. Savchenko A.A., Gvozdev I.I., Borisov A.G., Cherdantsev D.V., Perovova O.V., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V. Osobennosti fagotsitarnoy aktivnosti i sostoyaniya respiratornogo vzryva neytrofilov krovi u

- bol'nykh rasprostranennym gnoynym peritonitom v dinamike posleoperatsionnogo perioda [Peculiarities of phagocytic activity and state of respiratory burst of blood neutrophils in patients with generalized purulent peritonitis in the dynamics of the postoperative period]. *Infektsiya i immunitet* [Infection and Immunity]. 2017. T. 7. № 1. S. 51-60.
4. Cherdantsev D.V., Pervova O.V., V.A. Shapkina [et al.]. Kontseptsiya kompleksnogo podkhoda v vedenii patsientov s tyazhelymi formami rasprostanennogo gnoynogo peritonita [The concept of an integrated approach in the management of patients with severe forms of widespread purulent peritonitis]. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* [International Journal of Applied and Fundamental Research]. 2016. No. 12-3. pp. 498-503. EDN XENYNH.
 5. Borisov A.G., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V. [et al.]. Izmenenie fenotipa kletok vrozhdennogo immuniteta u bol'nykh s politravmoy v dinamike ispol'zovaniya vaksiny dlya profilaktiki sinegnoynoy palochki [Changes in the phenotype of innate immunity cells in patients with polytrauma in the dynamics of the use of a vaccine for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa*]. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* [Epidemiology and infectious diseases]. 2016. V. 21. No. 3. S. 124-129. EDN WBGJGZ.
 6. Savchenko A.A., Borisov A.G., Beleniuk V.D., Moshev A.V. Izmenenie subpopulyatsionnogo sostava i fagotsitarnoy aktivnosti monotsitov u bol'nykh rakom pochki pri vozdeystvii metabolitov in vitro [Changes in the subpopulation composition and phagocytic activity of monocytes in patients with kidney cancer under the influence of metabolites in vitro]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* [Bulletin of experimental biology and medicine]. 2021. V. 171. No. 3. S. 344-348. EDN DXFMLM.
 7. Beleniuk V.D., Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V. Osobennosti fenotipa V-limfotsitov krovi v zavisimosti ot iskhoda rasprostranennogo gnoynogo peritonita [Features of the phenotype of B-lymphocytes depending on the outcome of widespread purulent peritonitis]. *Infektsiya i immunitet* [Infection and immunity]. 2021. V. 11. No. 3. S. 454-462. EDN YINYGC.
 8. Savchenko A.A. TREC/KREC Levels and T and B Lymphocyte Subpopulations in COVID-19 Patients at Different Stages of the Disease / A.A. Savchenko, V. Beleniuk, A. Borisov [et al.] // *Viruses*. 2022. Vol. 14. No 3. P. 646. EDN OFHFVJ.

9. Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Beleniuk V.D. Fenotip NK-kletok v dinamike posleoperatsionnogo perioda u bol'nykh peritonitom v zavisimosti ot iskhoda zabolevaniya [Phenotype of NK cells in the dynamics of the postoperative period in patients with peritonitis depending on the outcome of the disease]. *Infektsiya i immunitet*. [Infection and immunity]. 2019. Vol. 9. No. 3-4. pp. 539-548. EDN ZLVPCT.
10. Savchenko A.A., Borisov A.G., Cherdantsev D.V., Pervova O.V. i dr. Regulyatornoe vliyanie monotsitov krovi na populyatsionnyy sostav granulotsitarnykh leykotsitov i sostoyanie ikh respiratornogo vzryva pri rasprostranennom gnoynom peritonite [Regulatory effect of blood monocytes on the population composition of granulocytic leukocytes and the state of their respiratory burst in case of widespread purulent peritonitis]. *Infektsiya i immunitet* [Infection and immunity]. 2018. T. 8. № 2. S. 201-210.

ДАНИЕ ОБ АВТОРЕ

Гвоздев Иван Игоревич, младший научный сотрудник

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера
ул. Партизана Железняка, 3Г, г. Красноярск, 660022, Российская Федерация
Leshman-mult@mail.ru*

DATA ABOUT THE AUTHOR

Ivan I. Gvozdev, junior researcher

*Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences" Research Institute of Medical Problems of the North
3G, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation
Leshman-mult@mail.ru
ORCID: 0000-0002-1041-9871*