

ОСОБЕННОСТИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА В ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ

Смирнова О. В.¹, Каспаров Э. В.¹, Перепечай Я. И.¹, Версенева А. А.², Лалетин И. А.²

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН» НИИ Медицинских проблем Севера (Красноярск, Россия)

² КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А. И. Крыжановского» (Красноярск, Россия)

THE FEATURES OF NONSPECIFIC IMMUNITY IN THE PROGRESSION OF COLORECTAL CANCER

Smirnova O. V.¹, Kasparov E. V.¹, Perepechay Ya. I.¹, Versenev A. A.², Laletin I. A.²

¹ Federal research center "Krasnoyarsk scientific center" Siberian branch of the Russian Academy of Sciences Research Institute of Medical Problems of the North (Krasnoyarsk, Russia)

² Krasnoyarsk regional clinical cancer center named. A. I. Kryzhanovsky (Krasnoyarsk, Russia)

Для цитирования: Смирнова О. В., Каспаров Э. В., Перепечай Я. И., Версенева А. А., Лалетин И. А. Особенности неспецифического звена иммунитета в прогрессировании рака прямой кишки. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;153(5): 73–77.

For citation: Smirnova O. V., Kasparov E. V., Perepechay Ya. I., Versenev A. A., Laletin I. A. The features of nonspecific immunity in the progression of colorectal cancer. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2018;153(5): 73–77.

Смирнова Ольга Валентиновна — д.м.н. доцент, заведующая лабораторией клинической патофизиологии

Каспаров Эдуард Вильямович — д.м.н. профессор, директор НИИ Медицинских проблем Севера, заместитель директора ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН»

Перепечай Ярослава Игоревна — аспирант, м.н.с. лаборатории клинической патофизиологии

Версенева Алексей Алексеевич — врач онколог, отделение онкологической колопроктологии

Лалетин Иван Алексеевич — врач хирург, отделение онкологической колопроктологии

Смирнова

Ольга Валентиновна

Smirnova Olga V.

ovsmirnova71@mail.ru

Резюме

Цель нашей работы — изучение спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов (НГ) у больных раком прямой кишки в динамике.

Материалы и методы. В исследование включены 56 больных раком прямой кишки. На I стадии находилось 9 человек, на II стадии 19 человек, на III 17 и на IV стадии 11 больных. Объектом изучения являются нейтрофильные гранулоциты, выделенные из венозной крови. Контрольная группа состояла из 112 практически здоровых добровольцев. Интенсивность синтеза активных форм кислорода НГ определяли методом хемилюминесцентного анализа.

Результаты. Исследование показало достоверное увеличение интенсивности спонтанного и индуцированного свечения и площади под кривой спонтанной хемилюминесценции на II–IV стадиях заболевания. При изучении зимо-зан-индуцированной хемилюминесценции, площадь под кривой увеличена у всех групп пациентов, при этом у больных на IV стадии суммарная продукция активных форм кислорода (АФК) достоверно выше, чем на I и II стадиях.

На 7 сутки после проведенного хирургического лечения интенсивность спонтанной хемилюминесценции остается повышенной только у пациентов на IV стадии РПК. Интенсивность индуцированной хемилюминесценции и площадь под кривой спонтанного и индуцированного свечения увеличена на всех стадиях заболевания относительно контроля.

Индекс активации был увеличен у пациентов на всех стадиях РПК как до операции, так и после.

Заключение. В результате исследования выявлено увеличение интенсивности синтеза АФК у больных РПК. При этом у пациентов на начальных стадиях продукция активных форм ниже, относительно группы больных на IV стадии заболевания. Увеличение индекса активации НГ на всех стадиях РПК характеризует метаболические возможности нейтрофилов к усиленному синтезу АФК при функциональной активации.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты; хемилюминесценция; рак прямой кишки

Summary

The purpose of our work is to study the spontaneous and induced chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes (NG) in patients with rectal cancer in dynamics.

Materials and methods. The study included 56 patients with rectal cancer. At the first stage there were 9 people, in the II stage 19 people, on the III 17 and at the IV stage 11 patients. The object of study are neutrophilic granulocytes isolated

from venous blood. The control group consisted of 112 healthy blood donors. The intensity of synthesis of active oxygen species of NG was determined by the method of chemiluminescence analysis.

Results. The study showed a significant increase in the intensity of spontaneous and induced luminescence and the area under the curve of spontaneous chemiluminescence in the II–IV stages of the disease. When studying zymosan-induced chemiluminescence, the area under the curve is increased in all groups of patients, while in patients at stage IV the total production of reactive oxygen species (ROS) is significantly higher than in stages I and II.

On the 7th day after the surgical treatment, the intensity of spontaneous chemiluminescence remains elevated only in patients at the IV stage of the rectal cancer. The intensity of induced chemiluminescence and the area under the curve of spontaneous and induced luminescence are increased at all stages of the disease with respect to control. The activation index was increased in patients at all stages of with rectal cancer both before and after surgery.

Conclusion. As a result of the study, an increase in the intensity of ROS synthesis in patients with rectal cancer was revealed. The total production of reactive oxygen species is higher in the late stage of the disease. An increase in the activation index of neutrophils in all stages of the RPC characterizes the metabolic capabilities of neutrophils to the enhanced synthesis of ROS in functional activation.

Keywords: neutrophilic granulocytes; chemiluminescence; rectal cancer

Введение

Рак прямой кишки (РПК) – одно из наиболее распространенных новообразований. Ежегодно в России более 50 тысяч человек заболевают и более 35 тысяч погибают от этого заболевания [1, 2, 3]. Нейтрофильные гранулоциты (НГ) традиционно рассматривались в контексте их антибактериальной функции, однако в последнее время большой интерес вызывают исследования функций нейтрофильных гранулоцитов в биологии опухолей [4,5]. Доказано цитотоксическое действие нейтрофильных гранулоцитов против различных опухолевых клеток [6, 7, 8]. Они способны

осуществлять фагоцитоз и антителозависимую клеточную токсичность по отношению к опухолевым клеткам. Фагоцитоз сопровождается респираторным взрывом, обусловленным образованием активных форм кислорода [9, 10]. Хемилиюминесцентный анализ НГ описывает интенсивность респираторного взрыва, который развивается в результате их контакта с объектами фагоцитоза. От состояния противоопухолевого иммунитета будут зависеть, как распространенность, так и скорость прогрессирования онкологического заболевания [11,12].

Материалы и методы исследования

В исследование включены 56 больных раком прямой кишки, в возрасте от 26 до 78 лет. Средний возраст обследованных больных составил $62 \pm 8,5$ лет. Среди пациентов с РПК мужчин было 45%, а женщин 55%. На I стадии находилось 17% больных (9 человек), на II стадии 34% (19 человек), на III – 30% больных РПК (17 пациентов) и на IV стадии заболевания 19% (11 больных). Всем больным оказывалось хирургическое пособие в различных объемах. Контрольная группа состояла из 112 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с группой обследованных больных. Группа контроля была отобрана при профилактических осмотрах в ЛПУ города Красноярска. Исследование проводилось с разрешения этических комитетов КГБУЗ «Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А. И. Крыжановского» и ФГБНУ ФИЦ КНЦ СО РАН НИИ «Медицинских проблем Севера», каждый участник исследования подписал форму добровольного информированного согласия. Объектом исследования служила венозная кровь, которую брали в вакуумные пробирки с литий гепарином утром натощак до проведения оперативного лечения и на 7 сутки после операции.

Интенсивность синтеза АФК нейтрофилами определяли методом хемилиюминесцентного анализа. Нейтрофильные гранулоциты выделяли из

крови путем центрифугирования в двойном градиенте плотности фиколл-урографина. Оценку спонтанной и индуцированной хемилиюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилиюминесцентном анализаторе «CL 3607» (Россия). Определялись следующие параметры: время выхода на максимум интенсивности хемилиюминесценции (T_{max}), максимальное значение интенсивности хемилиюминесценции (I_{max}) и площадь под кривой хемилиюминесценции (S). В качестве усилителя хемилиюминесценции использовали люминол. Люминол способен вступать в хемилиюминесцентную реакцию как с первичными, так и со вторичными активными формами кислорода [13]. Индуктором респираторного взрыва служил опсонизированный зимозан, который представляет собой полисахарид, получаемый из культуры *Saccharomyces cerevisiae* [14]. Индекс активации оценивали по соотношению площади индуцированной хемилиюминесценции ($S_{инд}$) к площади спонтанной ($S_{спонт}$) [15,16,17].

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 8.0. Для всех данных определяли медиану (Me) и интерквартильный диапазон (C_{25} – C_{75}), статистическую достоверность различий определяли с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Цитотоксическая активность нейтрофильных гранулоцитов обусловлена уровнем продукции активных форм кислорода. Люминол-зависимая хемилюминесценция формируется в системе миелопероксидазы и показывает суммарный синтез АФК. Анализ хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов показал достоверное увеличение активности спонтанной хемилюминесценции на II, III и IV стадиях заболевания. На II и III стадии спонтанная хемилюминесцентная активность НГ превышала показатели контрольной группы в 2,0 раза ($p < 0,05$), а на IV стадии в 2,8 раз ($p < 0,05$). (Таблица 1) Спонтанная хемилюминесцентная активность НГ на I стадии РПК была приближена к значениям контрольной группы, и была в 3,1 раза ($p < 0,05$) ниже показателей больных на IV стадии. Площадь под кривой спонтанной хемилюминесцентной активности НГ, характеризующая суммарный синтез АФК за время исследования, у больных РПК на II–IV стадиях была больше относительно группы здоровых людей, на II стадии в 5,5 раз ($p < 0,001$), на III стадии в 5,1 раз, а на IV стадии в 7,5 раз ($p < 0,001$). Причем площадь под кривой спонтанной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных на первой стадии была достоверно меньше относительно больных на IV стадии в 2,9 раз ($p < 0,05$). Время выхода кривой спонтанной хемилюминесценции НГ на максимум не имело статистически достоверных различий между группами.

Интенсивность индуцированной опсонизированным зимозаном хемилюминесценции НГ больных РПК на II–IV стадиях заболевания статистически значимо увеличена относительно группы здоровых людей. На II и III стадиях РПК

интенсивность индуцированной хемилюминесценции превышала показатель контрольной группы в 2,6 ($p < 0,001$) и 2,5 раз ($p < 0,001$) соответственно, а на IV стадии в 4,4 раз ($p < 0,001$). При этом параметры интенсивности индуцированного свечения у пациентов находящихся на I и II стадии были ниже ($p < 0,05$), по сравнению с больными на IV заболевания. Площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции у пациентов с раком прямой кишки была статистически значимо больше на всех стадиях РПК относительно контрольной группы: в 6,3 раза ($p < 0,05$) на I стадии, в 8,5 раз ($p < 0,001$) на II, в 7,9 раз ($p < 0,001$) на III стадии и на IV стадии в 13,6 раз ($p < 0,001$). Причем на IV стадии суммарная продукция АФК нейтрофилами превышает такую на I и II стадиях ($p < 0,05$).

Индекс активации НГ у больных раком прямой кишки на I стадии был выше, чем в группе здоровых людей в 7,5 раз ($p < 0,001$) II, III и IV стадиях индекс активации превышал показатели контрольной группы в 4,2, 4,5 и 4,7 раз соответственно ($p < 0,001$).

На 7 сутки после операции активность спонтанной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов остается достоверно повышенной в 3,4 раза ($p < 0,05$) только у больных на IV стадии РПК (Таблица 2).

Площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции у больных на всех стадиях онкологического процесса больше по сравнению с группой контроля, на I–II стадиях в 3,1 ($p < 0,05$), на III стадии в 6,0 ($p < 0,05$) и на IV стадии в 10,1 раз ($p < 0,001$).

Изучение параметров зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов больных РПК после оперативного лечения показало достоверное усиление свечения на II–IV

Показатели спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности	Контрольная группа, N=112		I стадия N=9		II стадия N=19		III стадия N=17		IV стадия N=11	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Tmax спонтанная	981	604–1522	1069	717–1406	1300	973–2005	911	780–1321	1198	1055–1444
Imax спонтанная	7978	3148–19815	7325	4855–17477	16521	55299–29014	16262	8394–26854	22612	9432–149772
			$p_4 < 0,05$		$p_k < 0,05$		$p_k < 0,05$		$p_k < 0,05$	
S спонтанная *10 ⁷	0,77	0,39–2,02	1,98	1,32–5,25	4,23	2,21–7,42	3,92	2,69–6,46	5,80	3,34–20,30
			$p_4 < 0,05$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$	
Tmax индуцированная	1117	766–1495	904	621–1427	1128	924–1365	936	809–1388	944	861–1372
Imax индуцированная	16864	6940–32097	20813	11529–93323	43843	25018–58654	42899	25503–91785	73466	34305–229974
			$p_4 < 0,05$		$p_k < 0,05$ $p_4 < 0,05$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$	
S индуцированная *10 ⁷	1,68	0,61–3,53	10,6	4,74–22,20	14,2	6,09–17,01	13,3	9,54–28,61	22,8	10,52–62,42
			$p_k < 0,05$ $p_4 < 0,05$		$p_k < 0,001$ $p_4 < 0,05$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$	
Индекс активации	0,586	0,41–0,76	4,40	2,18–6,55	2,45	1,58–3,81	2,62	2,06–5,47	2,739	2,56–6,82
			$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$	

Таблица 1

Показатели спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком прямой кишки до оперативного лечения.

Примечание:

p_k – достоверность различий относительно группы контроля

p_4 – достоверность различий относительно группы IV стадии

Таблица 2

Показатели спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком прямой кишки на 7 сутки после операции.

Примечание:

p_k – достоверность различий относительно группы контроля

p_4 – достоверность различий относительно группы IV стадии

Показатели спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности	Контрольная группа, N=112		I стадия в динамике N=9		II стадия в динамике N=19		III стадия в динамике N=17		IV стадия в динамике N=11	
	Me	$C_{25}-C_{75}$	Me	$C_{25}-C_{75}$	Me	$C_{25}-C_{75}$	Me	$C_{25}-C_{75}$	Me	$C_{25}-C_{75}$
Tmax спонтанная	981	604–1522	918	459–1079	1173	652–1969	1632	799–1947	1025	861–1377
Imax спонтанная	7978	3148–19815	12997	7733–21514	13759	4106–41570	10329	5606–22491	27213	22741–50209
S спонтанная *10 ⁷	0,773	0,39–2,02	2,41	1,37–4,34	2,32	1,35–7,82	4,64	1,66–6,31	7,80	5,94–12,2
			$p_k < 0,05$ $p_4 < 0,05$		$p_k < 0,05$ $p_4 < 0,05$		$p_k < 0,05$		$p_k < 0,001$	
Tmax индуцированная	1117	766–1495	1264	1079–1446	1401	1134–1586	1141	948–1477	1286	1001–1510
Imax индуцированная	16864	6940–32097	34763	20475–43686	53441	27488–93565	46090	27288–72356	96281	48289–115587
S индуцированная*10 ⁷	1,68	0,61–3,53	7,74	5,10–10,71	12,2	8,82–21,32	9,94	8,23–21,3	32,02	15,84–38,43
			$p_k < 0,05$ $p_4 < 0,05$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$	
Индекс активации	0,59	0,41–0,76	2,00	1,62–4,771	3,98	2,41–7,99	3,83	2,84–4,17	2,41	2,32–2,79
			$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$		$p_k < 0,001$	

стадиях онкологического процесса по сравнению с аналогичным параметром в контрольной группе, у больных на II стадии в 3,2 ($p < 0,05$), на III стадии в 2,7 ($p < 0,05$) и на IV стадии в 5,7 раз ($p < 0,001$).

Площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции на всех стадиях болезни больше относительно показателя в контрольной группе, на I стадии в 4,6 раз, на II стадии в 7,3 ($p < 0,001$), на III стадии 5,9 ($p < 0,001$) и на IV стадии в 19,0 раз ($p < 0,001$). Индекс активации нейтрофильных гранулоцитов больных РПК на 7 сутки после операции выше относительно контрольной группы

в ($p < 0,001$) 3,4 раза на I стадии в 6,8 на II стадии в 6,5 на III и на IV стадии в 4,1 раза. Увеличение индекса активации НГ на всех стадиях характеризует существующий уровень метаболических резервов для синтеза АФК.

Хемилюминесцентный анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных РПК, не выявил достоверного изменения времени выхода на максимум интенсивности кривых спонтанной и индуцированной хемилюминесценции на всех стадиях заболевания, относительно контроля.

Заключение

Развитие рака прямой кишки сопровождается изменением функциональных свойств периферических нейтрофильных гранулоцитов. Синтез АФК является важным защитным механизмом, который лежит в основе неспецифического иммунитета. У больных раком прямой кишки наблюдается увеличение интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах, что по-видимому связано с действием различных опухолевых факторов. У пациентов до оперативного лечения наблюдается увеличение спонтанной и индуцированной продукции активных форм кислорода нейтрофилами, при этом у больных на IV стадии РПК максимальная интенсивность хемилюминесценции выше, относительно пациентов на I стадии. Наблюдается увеличение площади под кривой люминол-зависимой хемилюминесценции, что свидетельствует о повышенной суммарной генерации АФК нейтрофилами больных РПК.

На 7 сутки после проведенного хирургического лечения интенсивность спонтанной хемилюминесценции, характеризующая генерацию АФК в состоянии относительного покоя, остается достоверно повышенной только у пациентов на IV стадии заболевания, что вероятно, происходит вследствие выраженности воспалительного синдрома, обусловленного обширностью хирургического пособия. А зимозан-индуцированная интенсивность, отражающая респираторный взрыв при дополнительной антигенной нагрузке, увеличена на II–IV стадиях. Суммарная генерация АФК нейтрофилами больных РПК, как и до операции, остается увеличенной по отношению к группе практически здоровых людей.

Индекс активации НГ как до, так и после операции превышает показатели здоровых людей, что говорит о способности нейтрофилов к усиленному синтезу АФК при функциональной активации.

Литература | Reference

1. Гордеев С.С., Барсуков Ю.А., Ткачёв С.И. и соавт. Местнораспространенный рак прямой кишки (мр-рРПК): определение, классификация, современные методы лечения // Вестник московского онкологического общества. – 2014. – № 2 – с.2–6.
2. Балканов А.С., Гуров А.Н., Катунцева Н.А., Белоусова Е.А. Заболеваемость раком прямой кишки населения Московской области в 2010–2014 гг // Альм клин мед. – 2016. – № 44 (5). – С. 599–605.
3. Райков Н.С., Чупин Р.Н., Попов И.Н. и соавт. Рак прямой кишки // Тюменский медицинский журнал. – 2010. – № 3–4. – С. 75–77.
4. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А. и соавт. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты // Иммунология. – 2012. – № 5. – С. 281–285.
5. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 6. – С. 467–474.
6. Fridlender Z.G., Albelda S.M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? // Carcinogenesis. – 2012. – Vol. 33, no. 5. – P. 949–955.
7. Finisguerra V., Di Conza G., Di Matteo M. et al. MET is required for the recruitment of anti-tumoral neutrophils // Nature. – 2015. – Vol. 522, no. 7556. – P. 349–353.
8. Swierczak A., Mouchemore K.A., Hamilton J.A., Anderson R.L. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis // Cancer Metastasis Rev. – 2015. – Vol. 34(4). – P.735–751.
9. Грачева Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 2. – С. 54–55.
10. Di Carlo E., Forni G., Lollini P.L., Colomobo M.P. et al. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions // Blood. – 2001. – Vol. 97(2): – P. 339–345.
11. Кут О.И., Франциянц Е.М., Никителова Е.А., Комарова Е.Ф. Состояние свободнорадикальных процессов в ткани злокачественной опухоли толстой кишки // Сиб. мед. обозрение. – 2014. – № 1. – С. 30–34
12. Prestwich R.J., Errington F., Hatfield P., Roodman D.G. The immune system – is it relevant to cancer development, progression and treatment? // Clin. Oncol. – 2008. – Vol. 20. – P. 101–112.
13. Коленчукова О.А., Савченко А.А., Смирнова С.В. Особенности нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом // Медицинская Иммунология. – 2010. – Т. 12, № 4–5. – С.385–390.
14. Schins R.P.F., Borm P.J.A., Van Schooten F.J. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review // Mutagenesis. – 2006. – Vol. 21. – P. 225–236.
15. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Агилова Ю.Н. Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных миеломной болезнью G-формы в зависимости от стадии заболевания // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17, № 6. – С. 579–584.
16. Смирнова О.В., Титова Н.М., Елманова Н.Г. Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов больных механической желтухой доброкачественного генеза // Российский иммунологический журнал. – 2015. Т. 2(1) (18). – С. 313–315.
17. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Агилова Ю.Н. Роль неспецифического иммунитета при прогрессировании миеломной болезни // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – С.515.