

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФУНКЦИОНАЛЬНО- МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ КОЖИ

Куртасова Л.М.¹, Арутюнян Г.А.², Шкапова Е.А.²,
Побилат А.Е.¹

¹ Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск

² Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского, г. Красноярск

Резюме. Обследовано 20 больных с базальноклеточным раком кожи в возрасте 56-70 лет. Изучены показатели клеточного и гуморального иммунитета, параметры фагоцитарной активности, спонтанная и стимулированная хемилюминесценция нейтрофилов периферической крови. Установлены изменения иммунофенотипического спектра лимфоцитов крови. Обнаружены дисиммуноглобулинемия и повышение ЦИК в сыворотке крови. Выявлены изменения фагоцитарной активности и кислородзависимого метаболизма нейтрофилов крови.

Ключевые слова: иммунитет, фагоцитоз, хемилюминесценция, базальноклеточный рак кожи.

Kurtasova L.M., Arutyunyan G.A., Shkapova E.A., Pobilat A.E.

IMMUNOLOGICAL PARAMETERS, FUNCTIONAL AND METABOLIC ACTIVITY OF BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH BASAL CELL SKIN CARCINOMA

Abstract. Twenty patients with basal cell skin carcinoma at the age of 56 to 70 years have been included into study. We have investigated multiple parameters of cellular and humoral immunity, features of phagocytic activity, spontaneous and stimulated chemiluminescence of peripheral blood neutrophils. Distinct changes in blood lymphocyte subsets have been assessed by immunophenotyping. Changes in serum immunoglobulin profiles and increased levels of circulating immune complexes were revealed. Altered phagocytic activity and oxygen-dependent metabolism of blood neutrophils were also detected. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 6, pp 561-565)

Keywords: immunity, phagocytosis, chemiluminescence, basal cell skin cancer.

Введение

Злокачественные новообразования кожи являются одними из наиболее частых онкологических

заболеваний. Современные статистические исследования показывают, что среди всех новообразований кожи наиболее часто встречается базальноклеточный рак кожи (БКР), который составляет до 50% всех эпителиальных опухолей. Заболевание возникает преимущественно в зрелом и преклонном возрасте [4].

В настоящее время доказана ведущая роль иммунной системы в противоопухолевой защите организма. При этом основная функция в противоопухолевом ответе принадлежит клеточному иммунитету, опосредованному естественными

Адрес для переписки:

Куртасова Людмила Михайловна, д.м.н.,
профессор кафедры клинической иммунологии,
Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
660022, г. Красноярск, ул. П. Железняка, 1.
Тел.: (3912) 220-06-28.
Факс: (3912) 22-16-38.
E-mail: aids@ktk.ru

киллерными клетками и специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами [1]. В то же время установлена способность нейтрофильных гранулоцитов к выраженному цитотоксическому действию на опухолевые клетки. Необходимо отметить, что цитопатическое действие нейтрофилов связано главным образом с генерацией активных форм кислорода [2, 3].

В соответствии с вышеизложенным, целью исследования явилось изучение иммунологических показателей, оценка фагоцитарной активности и параметров кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови у больных базальноклеточным раком кожи.

Материалы и методы

На базе Красноярского краевого клинического онкологического диспансера обследованы 20 пациентов с базальноклеточным раком кожи ($T_1N_0M_0$) в возрасте 56–70 лет в периоде до лечения. Клинический диагноз у всех больных был подтвержден результатами гистологического исследования. Группу контроля составили 56 человек аналогичного возраста без онкологических заболеваний.

Мононуклеары периферической крови выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина [5].

Методом непрямой иммунофлюоресценции, используя соответствующие FITC-меченные моноклональные антитела серии CD ООО «Сорбент» определяли содержание $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, $HLA-DR^+$ клеток в периферической крови. Содержание иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови оценивали методом радиальной иммунодиффузии в геле [8]. Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови исследовали в реакции с полиэтиленгликолем [7].

Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови определяли в реакции с частицами латекса. С помощью микроскопа «Ахуоlab А1» (Германия) рассчитывали процент фагоцитирующих нейтрофилов и фагоцитарное число, т.е. среднее число поглощенных одним нейтрофилом частиц.

Оценку спонтанной и индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови проводили на биохемилюминесцентном анализаторе «СЛМ3606» (Россия) по методу De Sole P. et al. [6]. Для проведения анализа к 5 мл гепаринизированной венозной крови добавляют 1 мл полиглокина. Данную смесь инкубируют в течение 30 мин при 37 °С (для ускорения осаждения эритроцитов). Далее переносят лейкоци-

тарный супернатант в центрифужные пробирки и дважды отмывают в растворе Хенкса без фенолового красного по 10 мин при 400 g. После второго центрифугирования супернатант сливают, а оставшиеся лейкоциты разводят в 1 мл раствора Хенкса. Затем проводится подсчет лейкоцитов в камере Горяева, в зависимости от числа клеток разводят лейкоцитарную взвесь раствором Хенкса таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 2 млн/мл. Поскольку хемилюминесцентная активность свойственна популяции нейтрофильных гранулоцитов периферической крови (остальные лейкоциты либо не обладают такой способностью, либо она ничтожно мала), то специального выделения данной клеточной фракции не осуществляли и далее в тексте обсуждается хемилюминесцентный ответ нейтрофилов. Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение (I_{max}) и площадь хемилюминесцентной кривой (S). В качестве индуктора «дыхательного взрыва» использовали опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл («Sigma», США). Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, относительно спонтанной хемилюминесценции оценивали соотношением $S_{zim.}/S_{спон.}$ и определяли как индекс активации.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 6.0» (StatSoft, Inc., США). Количественные параметры в группах сравнения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (LQ-UQ), где LQ-25% процентиль, UQ-75% процентиль. Проверка гипотезы о достоверности выборки проводили с помощью критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований выявили у больных БКР кожи на фоне повышенного количества лейкоцитов периферической крови снижение процентного содержания и увеличение абсолютного числа лимфоцитов относительно параметров контрольной группы (табл. 1).

Изучение иммунофенотипического спектра лимфоцитов периферической крови обнаружило статистически значимое снижение относительного числа и тенденцию к уменьшению абсолютного количества зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$) по сравнению с показателями группы контроля (табл. 1). Кроме того, наблюдалось достоверное увеличение процентного количества и тенденция к повышению абсолютного числа $CD16^+$ клеток

периферической крови в сравнении с контрольными величинами (табл. 1).

Одновременно с отмеченными изменениями установлено статистически значимое повышение содержания клеток, экспрессирующих активационный маркер HLA-DR⁺ относительно значений контрольной группы (табл. 1).

Реакция гуморального звена иммунитета характеризуется повышением концентрации IgA

и IgM в сыворотке крови по сравнению с показателями контрольной группы. При этом уровень IgG был статистически значимо снижен относительно параметров контроля. Содержание ЦИК в сыворотке крови значительно превышало значения контрольных величин (табл. 2).

Исследование показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у больных БКР кожи обнаружило тенденцию

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У БОЛЬНЫХ БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ КОЖИ (Me; LQ₂₅-UQ₇₅)

Параметры	Контрольная группа (n = 56)	Больные БКР кожи (n = 20)	Достоверность различий (p)
Лейкоциты, (10 ⁹ /л)	4,80 3,80-5,90	5,50 3,20-8,50	p < 0,05
Лимфоциты, (%)	28,50 25,00-36,00	24,00 12,00-30,00	p < 0,05
Лимфоциты, (10 ⁹ /л)	1,30 1,13-1,94	1,60 1,10-2,10	p < 0,05
CD3 ⁺ , (%)	47,00 43,00-52,00	30,00 28,00-42,00	p < 0,05
CD3 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,64 0,42-0,94	0,56 0,51-0,93	0,1 > p > 0,05
CD4 ⁺ , (%)	26,00 20,00-29,00	22,00 21,00-28,00	
CD4 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,35 0,24-0,52	0,29 0,23-0,56	
CD8, (%)	22,00 19,00-30,00	21,00 14,00-29,00	
CD8 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,30 0,23-0,57	0,36 0,17-0,59	
CD16 ⁺ , (%)	28,99 22,00-31,00	32,00 26,00-40,00	p < 0,05
CD16 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,40 0,28-0,59	0,53 0,30-0,82	0,1 > p > 0,05
CD19 ⁺ , (%)	26,00 20,00-31,00	26,00 19,00-25,00	
CD19 ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,36 0,25-0,59	0,43 0,21-0,50	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,00 0,69-1,50	1,17 0,83-1,90	
HLA-DR ⁺ , (%)	32,00 27,00-37,00	36,00 22,00-43,00	p < 0,05
HLA-DR ⁺ , (10 ⁹ /л)	0,43 0,35-0,70	0,59 0,29-0,88	p < 0,05
ФИ, (%)	35,00 22,00-44,00	29,00 8,00-42,00	
ФЧ, (о. е.)	5,50 2,00-10,50	3,50 1,0-6,80	0,1 > p > 0,05

Примечание. p – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы.

к понижению их поглотительной способности (табл. 1).

Результаты исследования показателей спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у больных БКР кожи выявило увеличение в 2,18 раза ($p < 0,05$) времени выхода на максимум хемилюминесценции и увеличение 2,82 раза ($p < 0,05$) площади хемилюминесцентной кривой по сравнению с параметрами контрольной группы (табл. 3). При индукции хемилюминесцентной реакции нейтрофилов крови опсонизиро-

ванным зимозаном у больных БКР кожи удлиняется время реагирования на стимул ($p < 0,05$), в 4,91 раза ($p < 0,01$) повышается уровень максимальной интенсивности свечения, в 7,77 раза ($p < 0,01$) увеличивается площадь хемилюминесцентной кривой относительно значений группы контроля (табл. 3). Кроме того, в 2,27 раза ($p < 0,05$) увеличивается индекс активации в сравнении с контрольными показателями, что отражает высокие компенсаторные возможности нейтрофильных гранулоцитов у больных БКР кожи (табл. 3).

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ КОЖИ (Me; LQ₂₅-UQ₇₅)

Параметры	Контрольная группа (n = 56)	Больные БКР кожи (n = 20)	Достоверность различий (p)
IgA, (г/л)	2,08 1,51-3,30	3,27 0,95-8,24	p < 0,05
IgG, (г/л)	8,54 6,85-12,70	6,94 3,51-21,00	p < 0,05
IgM, (г/л)	0,96 0,68-1,80	1,74 0,75-3,31	p < 0,05
ЦИК, (о.е.)	19,00 5,00-26,00	45,00 30,00-72,00	p < 0,01

Примечание. p – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы.

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ КОЖИ (Me; LQ₂₅-UQ₇₅)

Параметры	Контрольная группа (n = 44)	Больные БКР кожи (n = 20)	Достоверность различий (p)
Спонтанная хемилюминесценция			
Tmax, (сек.)	578,00 277,0-1530,0	1259,00 314,0-2100,0	p < 0,05
Imax, (о.е.*10 ³)	6,36 3,0-15,88	7,40 2,99-17,13	
S ₁ (о.е.*10 ⁵)	1,98 1,23-4,13	5,58 2,85 – 15,45	p < 0,05
Индукцированная хемилюминесценция			
Tmax, (сек.)	1270,00 896,5-1779,0	1755,00 677,0-2099,0	p < 0,05
Imax, (о.е.*10 ³)	9,86 4,98-36,65	48,50 22,11-52,90	p < 0,01
S ₂ (о.е.*10 ⁵)	3,28 1,52-9,28	25,50 8,31-31,20	p < 0,01
Индекс активации			
S ₂ /S ₁ (о.е.)	1,87 1,38-3,10	4,25 2,96-12,40	p < 0,05

Примечание. p – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы.

Заключение

Результаты проведенных исследований установили у больных БКР кожи на фоне относительной лимфопении изменения иммунофенотипического спектра лимфоцитов периферической крови. У данной категории пациентов наблюдается понижение количества зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), повышается содержание CD16⁺ клеток, увеличивается число клеток, экспрессирующих маркер поздней активации (HLA-DR⁺). При изучении показателей гуморального звена иммунитета обнаружено увеличение концентрации IgA, IgM и понижение уровня IgG в сыворотке крови. Следует отметить повышение содержания ЦИК в сыворотке больных БКР кожи. Кроме того, наблюдается выраженная тенденция к снижению поглотительной способности нейтрофилов крови, изменения кинетики и интенсивности хемилюминесцентного ответа, отражающих кислородзависимые механизмы биоцидности данных клеточных популяций.

Список литературы

1. Козлов В.А., Черных Е.Р. Современные проблемы иммунотерапии в онкологии // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – № 2. – С. 13-14.
2. Мальцева В.Н., Авхачева Н.В., Сафронова В.Г. Общие закономерности в изменениях функциональной активности нейтрофилов при

росте in vivo опухолей разной иммуногенности // Иммунология. – 2009. – № 2. – С. 116-119.

3. Пинегин Б.В., Маянский А.Н. Нейтрофилы: структура и функции // Иммунология. – 2007. – № 6. – С. 374-372.

4. Рукша Т.Г. Современные представления об этиопатогенезе базально-клеточной карциномы // Сибирский журнал дерматологии и венерологии. – 2007. – № 8. – С.34-39.

5. Boyum A. Isolation of lymphocytes from blood and bone marrow // Scand. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 97, N 21. – P. 77-80.

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

7. Haskova V., Kaslik J., Riha J., Rovensky J. Simple method of circulating immune complex detection in human sera by polyethylene glycol precipitation // J. Immunol. – 1978. – Vol. 154. – P. 399-406.

8. Mancini G., Carbonaro A.O., Haremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial diffusion // Immunochemistry. – 1965. – Vol. 2, N 3. – P. 235-255.

поступила в редакцию 01.03.2012

отправлена на доработку 19.03.2012

принята к печати 10.04.2012