

## **ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ**

**Савченко А.А.<sup>1</sup>, Борисов А.Г.<sup>1</sup>, Модестов А.А.<sup>2</sup>, Мошев А.В.<sup>1</sup>,  
Кудрявцев И.В.<sup>3,4</sup>, Тоначева О.Г.<sup>2</sup>, Кошечев В.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского», г. Красноярск, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Целью исследования явилось изучение особенности взаимосвязи фенотипического состава моноцитов с их уровнем «респираторного взрыва» у больных почечно-клеточным раком (ПКР). Обследовано 73 больных ПКР (Т3N0M0, светлоклеточный тип). Исследование фенотипа моноцитов проводили методом проточной цитометрии. Уровень «респираторного взрыва» в моноцитах определяли с помощью спонтанной и зимозан-индуцированной люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции. У больных ПКР установлены изменения в фенотипическом составе и интенсивности «респираторного взрыва» моноцитов периферической крови. Изменения в субпопуляционном составе моноцитов при ПКР определяются увеличением количества клеток с фенотипом CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> («неклассические»). Установлен дисбаланс в экспрессии активационных маркеров на моноцитах онкологических больных: снижается количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR-антиген, и повышается число клеток с экспрессией CD64. Интенсивность «респираторного взрыва» в общей фракции моноцитов крови при ПКР снижена. При этом выявляются особенности в распределении интенсивности «респираторного взрыва» по субпопуляциям моноцитов: при ПКР снижается активность «респираторного взрыва» в моноцитах с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, но повышается в моноцитах с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>. Подобное перераспределение может быть связано с повышением роли данных субпопуляций моноцитов в иммунопатогенезе почечно-клеточного рака.

*Ключевые слова:* почечно-клеточный рак, моноциты, субпопуляции, функциональная активность, маркеры активации, респираторный взрыв

### **Адрес для переписки:**

Кудрявцев Игорь Владимирович  
ФГБНУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.  
Тел.: 8 (921) 633-80-21.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

### **Address for correspondence:**

Kudryavtsev Igor V.  
Research Institute of Experimental Medicine  
197376, Russian Federation, St. Petersburg,  
Acad. I.P. Pavlov str., 12.  
Phone: 7 (921) 633-80-21.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

### **Образец цитирования:**

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, А.А. Модестов, А.В. Мошев,  
И.В. Кудрявцев, О.Г. Тоначева, В.Н. Кошечев,  
«Фенотипический состав и хемилюминесцентная  
активность моноцитов у больных почечно-клеточным  
раком» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2.  
С. 141–150.  
doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-141-150

### **For citation:**

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, A.A. Modestov, A.V. Moshev,  
I.V. Kudryavtsev, O.G. Tonacheva, V.N. Koshcheev,  
“Subpopulations and chemiluminescent activity of monocytes in  
patients with renal cell carcinoma”, *Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 141–150.  
doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-141-150

© Савченко А.А. и соавт., 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-141-150>

# MONOCYTES SUBPOPULATIONS AND CHEMILUMINESCENT ACTIVITY IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

Savchenko A.A.<sup>a</sup>, Borisov A.G.<sup>a</sup>, Modestov A.A.<sup>b</sup>, Moshev A.V.<sup>a</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>c,d</sup>, Tonacheva O.G.<sup>b</sup>, Koshcheev V.N.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute for Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Krasnoyarsk A.I. Kryzhanovsky Regional Clinical Oncology Center, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Abstract.** The aim of present study was to investigate the relationship between phenotypic features of monocytes and intensity of “respiratory burst” in the patients with renal cell carcinoma (RCC). A total of 73 patients with RCC (T3N0M0, clear cell type) participated in the study. Phenotyping of blood monocytes was performed by flow cytometry. The level of “respiratory burst” in monocytes was determined using spontaneous and zymosan-induced luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. Sufficient changes in phenotypic structure and intensity of “respiratory burst” were identified in peripheral blood monocytes of the patients. Alterations of monocytic subpopulations in RCC were characterized by increased numbers of cells with the CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> (“non-classical”) phenotype. The imbalance in expression of activation markers was found among monocyte populations from cancer patients; we have revealed a reduced number of monocytes expressing HLA-DR-antigen, and increased number of CD64-positive cells. Meanwhile, intensity of “respiratory burst” in the total monocyte population proved to be reduced in RCC patients. In this case, the characteristic features of the “respiratory burst” intensity distribution among monocytes were as follows: in RCC, a reduced “respiratory burst” activity was found in monocytes with CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> phenotype, being, however, increased in the monocytes with CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> phenotypes. Such redistribution may be due to increasing role of the given monocyte subsets in immunopathogenesis of renal cell carcinoma.

*Keywords:* renal cancer cells, monocytes, subpopulations, functional activity, activation markers, respiratory burst

## Введение

Почечно-клеточный рак (ПКР) относится к числу наиболее тяжелых онкоурологических заболеваний. Число случаев поздней диагностики рака почки в 3 раза выше, чем при других урологических новообразованиях, а результаты лечения данного заболевания свидетельствуют, что у 40-50% больных в течение первого года после лечения появляются метастазы [1, 6, 11].

В настоящее время большое внимание уделяется роли моноцитов в иммунопатогенезе онкологических заболеваний. Во-первых, это связано с тем, что моноциты, являясь составной частью системы мононуклеарных фагоцитов, играют важную роль в регуляции иммунных реакций [10, 29, 30]. Во-вторых, доказано, что дендритные клетки, предшественниками некоторых популяций которых являются моноциты, инициируют развитие адаптивного иммунитета, в том числе стимулируют развитие противоопухолевых иммунных реакций [15, 28, 36]. И, в третьих, мо-

ноциты принимают участие в реализации воспалительных процессов, роль которых при опухолевом росте активно изучается [13, 16, 19, 21].

Следует отметить, что моноциты периферической крови, рассматривавшиеся долгое время в качестве единой группы клеток, на основании функциональной активности и экспрессии некоторых поверхностных антигенов подразделяются на несколько различных популяций [2, 12, 37]. Так, циркулирующие моноциты можно разделять по фенотипическим характеристикам как минимум на две популяции, различающиеся по уровням экспрессии поверхностных молекул — компонента рецепторного комплекса для бактериального липопосахарида CD14 и высокоаффинного рецептора Fcγ CD16. Клетки, несущей на своей поверхности только CD14, принято называть «классическими моноцитами», так как в норме они составляют до 95% от общего числа циркулирующих моноцитов. Тогда как моноциты, обладающие фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, определяются как «неклассические» или «про-

воспалительные» [38]. Увеличение количества последних имеет место при различных патологических процессах, включая сепсис, острые и хронические воспалительные заболевания вирусной и бактериальной этиологии и т.д. В ряде случаев выделяют дополнительную группу моноцитов с фенотипом CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> или CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, которые принято называть «промежуточными» [18].

Популяции моноцитов различаются не только по экспрессии CD14 и CD16, но и существенно отличаются друг от друга по своим функциональным свойствам, к числу которых отнесены профиль синтезируемых цитокинов и хемокинов, способность к фагоцитозу, а также синтезу и секреции активных форм кислорода и оксида азота [8, 12, 33]. В связи с этим функциональные особенности моноцитов могут также оцениваться и по уровню «респираторного взрыва», который характеризуется хемилюминесцентной активностью клеток при их взаимодействии с объектами фагоцитоза [3, 27]. Обсуждается значение синтеза ряда активных форм кислорода в системе внешнего киллинга.

Таким образом, целью исследования явилось изучение особенности взаимосвязи фенотипического состава моноцитов с их уровнем «респираторного взрыва» у больных ПКР.

## Материалы и методы

На базе КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» обследованы больные ПКР (Т3N0M0, светлоклеточный тип) в возрасте 40-55 лет до хирургического лечения (n = 73). Диагноз ПКР у всех больных верифицирован гистологически. В качестве контрольной группы было обследовано 83 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа моноцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: HLA-DR-FITC/CD14-PE/CD45-ECD/CD64-PC5/CD16-PC7. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [24]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500

(Beckman Coulter, USA) [9, 23]. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 моноцитов.

Моноциты периферической крови получали стандартным методом адгезии к плоским поверхностям из мононуклеарных клеток, выделенных из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколлурографина ( $\rho = 1,077$ ) [17]. Исследование интенсивности «респираторного взрыва» моноцитов осуществляли через определение активности люцигенин- и люминол-зависимой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции. Хемилюминесцентная активность оценивалась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3606» (Россия) [7]. Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной (Синд./Спонт.) и определяли как индекс активации.

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.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (Q<sub>25</sub> и Q<sub>75</sub>). Достоверность различий между показателями независимых выборок (сравнение с показателями контрольной группы) оценивали по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (r). Статистический анализ осуществляли в пакете программ Statistica 6.1 (StatSoft Inc., 2007).

## Результаты

В результате проведения цитометрического анализа обнаружено, что у больных ПКР в периферической крови количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов не отличается от уровня контрольной группы (табл. 1). В то же время процентное и абсолютное содержание CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов снижено. У больных ПКР в периферической крови снижено

ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ПКР, Ме (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)

Показатели	Контроль (n = 83)	ПКР (n = 73)	p
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,44 (0,35-0,56)	0,45 (0,34-0,63)	
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> , %	33,9 (16,2-52,2)	35,1 (19,7-49,8)	
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,15 (0,04-0,23)	0,13 (0,09-0,20)	
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> , %	37,9 (19,5-59,8)	33,2 (24,5-51,5)	
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,14 (0,05-0,25)	0,15 (0,09-0,26)	
CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup> , %	5,7 (3,9-10,1)	7,9 (5,0-11,2)	0,023
CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,02 (0,01-0,04)	0,03 (0,02-0,05)	0,033
HLA-DR <sup>+</sup> , %	88,0 (83,3-92,2)	83,0 (74,9-88,2)	0,007
HLA-DR <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,36 (0,28-0,45)	0,37 (0,27-0,49)	
CD64 <sup>+</sup> , %	87,8 (81,8-92,8)	89,3 (85,1-94,5)	0,036
CD64 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,39 (0,31-0,47)	0,35 (0,25-0,46)	0,001
HLA-DR <sup>+</sup> CD64 <sup>+</sup> , %	87,9 (72,2-98,9)	73,8 (58,4-79,8)	< 0,001
HLA-DR <sup>+</sup> CD64 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,35 (0,29-0,46)	0,29 (0,21-0,40)	

ТАБЛИЦА 2. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ПКР, Ме (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>)

Показатели	Контроль (n = 83)	ПКР (n = 73)	p
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция			
Tmax, сек.	1945 (1439-2546)	1588 (959-2400)	
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	0,66 (0,44-1,51)	0,76 (0,37-1,62)	
S, о.е. × сек. × 10 <sup>6</sup>	2,96 (1,84-7,02)	3,32 (1,54-5,96)	
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция			
Tmax, сек.	1752 (1371-1863)	1938 (1396-2327)	
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	2,18 (1,12-9,42)	1,75 (0,57-3,22)	
S, о.е. × сек. × 10 <sup>6</sup>	14,38 (4,11-44,55)	5,86 (2,05-11,50)	0,003
Синд./ Спонт.	2,98 (1,65-5,31)	1,46 (1,03-2,45)	0,045
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция			
Tmax, сек.	1508 (411-2328)	1242 (547-1720)	
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	4,14 (1,10-14,86)	1,71 (0,71-4,40)	0,034
S, о.е. × сек. × 10 <sup>6</sup>	10,27 (3,51-42,86)	5,38 (2,47-16,75)	0,048
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция			
Tmax, сек.	1105 (754-1780)	1035 (583-1600)	
I <sub>max</sub> , о.е. × 10 <sup>3</sup>	10,86 (1,42-29,51)	5,25 (1,77-9,75)	0,031
S, о.е.	38,71 (4,45-75,71)	18,29 (4,04-33,18)	0,027
Синд./ Спонт. × сек. × 10 <sup>6</sup>	1,84 (1,48-3,31)	1,92 (1,10-4,30)	

**ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ФЕНОТИПОМ МОНОЦИТОВ И ИХ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ У ЛИЦ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ И БОЛЬНЫХ ПКР, СОВПАДАЮЩИЕ ПО КОРРЕЛИРУЮЩИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ**

Фенотип	Хемилюминесцентные показатели	Контроль n = 83		ПКР n = 73	
		r	p	r	p
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	Tmax, спонтанная люминол-зависимая	-0,62	0,025	-0,43	0,025
	S, индуцированная люминол-зависимая	0,62	0,025	-0,46	0,017
	Imax, индуцированная люцигенин-зависимая	0,60	0,029	-0,43	0,024
	S, индуцированная люцигенин-зависимая	0,63	0,022	-0,53	0,005
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	Imax, индуцированная люминол-зависимая	-0,57	0,041	0,60	0,001
	S, индуцированная люминол-зависимая	-0,65	0,017	0,55	0,004
	Imax, индуцированная люцигенин-зависимая	-0,69	0,010	0,39	0,046
	S, индуцированная люцигенин-зависимая	-0,71	0,006	0,48	0,010

относительное количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR-рецептор, но повышено процентное и абсолютное содержание моноцитов с экспрессией CD64. При этом относительные уровень HLA-DR<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> моноцитов в крови больных ПКР снижен относительно контрольного уровня.

При исследовании хемилюминесцентной активности моноцитов обнаружено, что у больных ПКР все показатели спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции соответствуют контрольному диапазону (табл. 2). В то же время площадь под кривой зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов при онкопатологии снижена, что, соответственно, привело к понижению индекса активации данного типа хемилюминесцентной реакции. Кроме того, у больных ПКР снижен максимум интенсивности и площадь под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции. В связи с этим индекс активации по люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови у больных ПКР соответствует контрольному диапазону.

С помощью корреляционного анализа обнаружено, что взаимосвязь между фенотипическим составом моноцитов и показателями хемилюминесцентной активности у лиц контрольной

группы и больных ПКР значительно различается. Так, только у здоровых людей выявлены корреляционные связи относительного количества CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов с максимумом интенсивности спонтанной ( $r = -0,56$ ,  $p = 0,046$ ) и индексом активации ( $r = -0,58$ ,  $p = 0,037$ ) люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Кроме того, у лиц контрольной группы также обнаружены корреляционные связи между данным фенотипом моноцитов и показателями люминол-зависимой хемилюминесценции: с максимумом интенсивности ( $r = -0,74$ ,  $p = 0,004$ ) и площадью под кривой ( $r = -0,78$ ,  $p = 0,002$ ) спонтанной хемилюминесценции. Процентное содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитов крови у лиц контрольной группы положительно взаимосвязано с максимумом интенсивности ( $r = 0,68$ ,  $p = 0,010$ ) и площадью кривой ( $r = 0,71$ ,  $p = 0,006$ ) спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции.

Только у больных ПКР выявляются корреляционные связи между процентным уровнем CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов и индексом активации люминол-зависимой хемилюминесценции ( $r = 0,47$ ,  $p = 0,017$ ), между относительным количеством CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитов и максимумом интенсивности индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции ( $r = -0,43$ ,  $p = 0,027$ ), а также между процентным содержанием CD64<sup>+</sup>

моноцитов и максимумом интенсивности индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции ( $r = 0,60$ ,  $p = 0,010$ ). Только у больных ПКР выявляются корреляционные связи относительного количества  $CD14^{low}CD16^{+}$  моноцитов с хемилюминесцентными показателями: с максимумом интенсивности ( $r = 0,46$ ,  $p = 0,015$ ) и площадью под кривой ( $r = 0,46$ ,  $p = 0,015$ ) спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции и с максимумом интенсивности ( $r = 0,44$ ,  $p = 0,021$ ) и площадью под кривой ( $r = 0,60$ ,  $p = 0,010$ ) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции.

Некоторые корреляционные взаимосвязи выявляются и у здоровых людей и у больных с онкопатологией (табл. 3). Взаимосвязь между процентным количеством  $CD14^{+}CD16^{-}$  моноцитов и временем выхода на максимум спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции является единственной, совпадающей и по показателям, и по знаку корреляции. В остальных случаях при ПКР наблюдается инверсия знака корреляции. Причем относительное количество  $CD14^{+}CD16^{-}$  моноцитов с хемилюминесцентными показателями у лиц контрольной группы взаимосвязано отрицательно, тогда как при ПКР — положительно. И наоборот, относительное количество  $CD14^{+}CD16^{+}$  моноцитов с хемилюминесцентными показателями у лиц контрольной группы взаимосвязано положительно, тогда как при ПКР — отрицательно.

## Обсуждение

Функциональная активность моноцитов (в том числе и при опухолевом росте) осуществляется исходя из их количества и субпопуляционного состава в периферической крови. Субпопуляция «классических» моноцитов представлена крупными клетками с высоким уровнем фагоцитарной активности. Для данной субпопуляции характерен повышенный уровень экспрессии CCR2, CD36, CD64, CD62L и низкий уровень синтеза фактора некроза опухоли- $\alpha$  и интерлейкина-1, а также высокая активность ферментов, осуществляющих «респираторный взрыв» [12, 18, 31]. «Неклассические» моноциты определяются как сравнительно небольшие клетки с низкой фагоцитарной и оксидазной активностью и, соответственно, с пониженным уровнем «респираторного взрыва». На их поверхности хорошо представлены CX3CR1, CD11c и HLA-DR, тогда как CD62L и CD64 практически отсутствуют. «Промежуточный» тип моноцитов определяется как «провоспалительный» в связи с активной продукцией провоспалительных цитокинов —

TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, на поверхности этих клеток HLA-DR, CD36 и CD64 представлены на высоком уровне [8, 12, 34].

В периферической крови больных ПКР содержание  $CD14^{+}CD16^{-}$  и  $CD14^{+}CD16^{+}$  моноцитов соответствует контрольному диапазону. В то же время количество моноцитов, относящихся к «неклассическому» типу, повышено. Необходимо отметить, что именно популяция моноцитов с фенотипом  $CD14^{low}CD16^{+}$  обладает повышенной способностью мигрировать через эндотелий и дифференцироваться в дендритные клетки, которые инициируют развитие адаптивного иммунитета, в том числе и при опухолевом росте [8, 35]. Однако, установлено, что при стимуляции *in vitro* функциональной активности моноцитов опухолевыми клетками именно популяция «классических» моноцитов проявляла выраженную способность к синтезу хемокинов, тогда как «неклассические» моноциты подобной активностью обладали в значительно меньше степени [32].

Выявляются особенности в экспрессии активационных маркеров моноцитами крови у больных ПКР. Так, при ПКР в периферической крови больных повышается количество моноцитов, экспрессирующих CD64, но снижается содержание клеток с экспрессией HLA-DR и фенотипом HLA-DR $^{+}$ CD64 $^{+}$ . CD64 (Fc $\gamma$ RI) является высокоаффинным рецептором к Fc-фрагментам иммуноглобулинов G [20, 25]. Обнаружено, что экспрессия CD64 на моноцитах индуцируется интерфероном- $\gamma$ , после чего моноциты, экспрессирующие CD64, дифференцируются в дендритные клетки с более высокой миграционной способностью [20, 22]. HLA-DR-рецептор является продуктом главного комплекса гистосовместимости II класса, принимает участие в презентации антигенов [14, 26]. Доказано, что моноциты с уменьшенной или отсутствующей экспрессией HLA-DR-антигена не могут выполнять антиген-презентирующую функцию и не синтезируют провоспалительные цитокины в ответ на соответствующие стимулы [4]. В целом, исходя из особенностей фенотипического состава моноцитов в периферической крови больных ПКР, можно заключить, что почечно-клеточный рак влияет на изменение субпопуляционного состава моноцитов и уровень экспрессии ими активационных антигенов.

При ПКР значительно изменяется хемилюминесцентная активность моноцитов периферической крови. Оценка особенностей «респираторного взрыва» осуществлялась с применением двух хемилюминесцентных индикаторов: люцигенина и люминола. Люцигенин окисляется и люминес-

цирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная активная форма кислорода и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы [3, 5, 7]. Следовательно, исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов позволяет охарактеризовать состояние активности НАДФН-оксидазы у больных ПКР. Обнаружено, что при ПКР уровень синтеза супероксид-радикала моноцитами крови, находящимися в состоянии относительного покоя (спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция), соответствует контрольному диапазону. В то же время при дополнительной индукции «респираторного взрыва» с помощью опсонизированного зимозана активность НАДФН-оксидазы у больных с онкопатологией снижается. Также при ПКР понижается величина индекса активации по люцигенин-зависимой хемилюминесценции, который характеризует уровень метаболических резервов для синтеза соответствующих активных форм кислорода [5].

Цитотоксическая активность моноцитов определяется уровнем продукции как первичных, так и вторичных активных форм (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.) кислорода. В формировании пула вторичных форм кислорода принимают участие такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. Люминол способен вступать в хемилюминесцентную реакцию и с первичными, и с вторичными активными формами кислорода [3, 5]. Снижение максимума интенсивности и площади под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови у больных ПКР определяет пониженный уровень «респираторного взрыва», что в целом характеризует недостаточность цитотоксической активности моноцитов при почечно-клеточном раке.

С помощью корреляционного анализа мы исследовали зависимость хемилюминесцентной активности от фенотипического состава моноцитов периферической крови у больных ПКР. Как уже отмечалось выше, максимальной активностью ферментов «респираторного взрыва» обладают моноциты с фенотипом  $CD14^+CD16^-$  («классические») [34]. Действительно, у лиц контрольной группы практически все корреляционные связи между содержанием  $CD14^+CD16^-$  моноцитов и хемилюминесцентными показателями положительны, на основании чего можно заключить, что люцигенин- и люминол-зависимая хемилюминесценция общей фракции моноцитов крови у лиц контрольной группы определяется преимущественно субпопуляцией «классических»

моноцитов. Взаимосвязь между относительным количеством  $CD14^+CD16^-$  моноцитов и временем выхода на максимум спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции является единственной отрицательной корреляционной связью у лиц контрольной группы для данной субпопуляции моноцитов. Кроме того, данная взаимосвязь является и единственной совпадающей в группах лиц контрольной группы и больных ПКР. Время выхода на максимум характеризует скорость развития «респираторного взрыва» в случае регуляторного или антигенного воздействия на клетку. Соответственно, для субпопуляции «классических» моноцитов лиц контрольной группы характерна высокая скорость развития и повышенный уровень «респираторного взрыва». Для моноцитов с фенотипом  $CD14^{low}CD16^+$  («неклассические») в контрольной группе не выявлены взаимосвязи с хемилюминесцентными показателями, что характерно для клеток с низкой фагоцитарной и оксидазной активностью. В то же время моноциты с фенотипом  $CD14^+CD16^+$  («промежуточные») у лиц контрольной группы только отрицательно взаимосвязаны с хемилюминесцентными показателями, что определяет их минимальный вклад в хемилюминесцентную активность общей фракции моноцитов.

У больных ПКР выявляется обратная зависимость хемилюминесцентной активности моноцитов от их субпопуляционного состава. Субпопуляция моноцитов с фенотипом  $CD14^+CD16^-$  («классические») отрицательно взаимосвязана с хемилюминесцентными показателями, то есть «респираторный взрыв» данной фракции моноцитов значительно снижен. В то же время моноциты с фенотипом  $CD14^+CD16^+$  («промежуточные»), у которых должна быть низкая оксидазная активность, при онкопатологии, наоборот, проявляют положительную зависимость с хемилюминесцентными показателями. Кроме того, только при ПКР выявляется положительная взаимосвязь с показателями «респираторного взрыва» моноцитов с фенотипом  $CD14^{low}CD16^+$  («неклассические»), которые также не проявляют значимую оксидазную активность. Только при ПКР обнаружена положительная взаимосвязь максимума интенсивности индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции с относительным количеством моноцитов, экспрессирующих CD64. Можно предположить, что при опухолевом росте функциональная активность «классических» моноцитов подавлена, соответственно, значимость моноцитов с фенотипами  $CD14^{low}CD16^+$  и  $CD14^+CD16^+$  в реализации хемилюминесцент-

ной реакции повышается. При этом проявляется положительная зависимость интенсивности хемилюминесценции от уровня экспрессии активационных антигенов.

Таким образом, у больных ПКР установлены изменения в фенотипическом составе и интенсивности «респираторного взрыва» моноцитов периферической крови. Изменения в субпопуляционном составе моноцитов при ПКР определяются увеличением количества клеток с фенотипом  $CD14^{low}CD16^{+}$  («неклассические»). Наблюдается дисбаланс в экспрессии активационных маркеров на моноцитах онкологических больных: снижается количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR-антиген, и повы-

шается число клеток с экспрессией CD64. Интенсивность «респираторного взрыва» в общей фракции моноцитов крови при ПКР снижена. При этом выявляются особенности в распределении интенсивности «респираторного взрыва» по субпопуляциям моноцитов. С помощью корреляционного анализа обнаружено, что при ПКР снижается активность «респираторного взрыва» в моноцитах с фенотипом  $CD14^{+}CD16^{-}$ , но повышается в моноцитах с фенотипом  $CD14^{+}CD16^{+}$  и  $CD14^{low}CD16^{+}$ . Подобное перераспределение может быть связано с повышением роли данных субпопуляций моноцитов в иммунопатогенезе почечно-клеточного рака.

## Список литературы / References

1. Аполихин О.И., Сивков А.В., Солнцева Т.В., Комарова В.А. Анализ урологической заболеваемости в Российской Федерации в 2005-2010 годах // Экспериментальная и клиническая урология, 2012. № 2. С. 4-12. [Apolihin O.I., Sivkov A.V., Solnceva T.V., Komarova V.A. Analysis of urologic diseases in the Russian Federation in 2005-2010. *Ekspериментal'naya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology*, 2012, no. 2, pp. 4-12. (In Russ.)]
2. Головкин А.С., Матвеева В.Г., Кудрявцев И.В., Григорьев Е.В., Великанова Е.А., Байракова Ю.В. Субпопуляции моноцитов крови при неосложненном течении периоперационного периода коронарного шунтирования // Медицинская иммунология, 2012, Т. 14, № 4-5. С. 305-312. [Golovkin A.S., Matveeva V.G., Kudrjavcev I.V., Grigor'ev E.V., Velikanova E.A., Bajrakova Ju.V. Blood monocyte subpopulations during uncomplicated coronary artery bypass surgery. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 305-312. (In Russ.)]
3. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии, 2009. Т. 49. С. 341-388. [Vladimirov Ju.A., Proskurina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances of Biological Chemistry*, 2009, Vol. 49, pp. 341-388. (In Russ.)]
4. Зурочка А.В., Котляров А.Н., Кувайцев М.В., Квятковская С.В., Зурочка В.А., Рябова Л.В., Хайдуков С.В. Изменение экспрессии HLA-DR-антигенов на моноцитах у детей и ее клиническая значимость при сепсисе // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 379-388. [Zurochka A.V., Kotljarov A.N., Kuvajcev M.V., Kvjatkovskaja S.V., Zurochka V.A., Rjabova L.V., Khajdukov S.V. Changes of HLA-DR antigen expression on monocytes in children and their clinical significance in sepsis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 4-5, pp. 379-388. (In Russ.)]
5. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Шкапова Е.А. Клинические аспекты функциональных нарушений нейтрофильных гранулоцитов при онкопатологии. Новосибирск: Наука, 2009. 184 с. [Kurtasova L.M., Savchenko A.A., Shkapova E.A. Clinical aspects of functional disorders of neutrophil granulocytes in oncopathology]. Novosibirsk: Nauka, 2009. 184 p.
6. Писарева Л.Ф., Бояркина А. П., Одинцова И.Н., Гурина Л.И., Алексеева Г.Н. Эпидемиология рака почки в регионе Сибири и Дальнего Востока (1994-2008) // Урология, 2013. № 3. С. 52-56. [Pisareva L.F., Bojarkina A.P., Odincova I.N., Gurina L.I., Alekseeva G.N. The epidemiology of kidney cancer in the region of Siberia and the Far East (1994-2008). *Urologiya = Urology*, 2013, no. 3, pp. 52-56. (In Russ.)]
7. Савченко А.А., Здзитовецкий А.Г., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная и энзиматическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания // Вестник РАМН, 2014. № 4-5. С. 23-28. [Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Chemiluminescent and Enzyme Activity of Neutrophils in Patients with Widespread Purulent Peritonitis Depending on the Outcome of Disease. *Vestnik RAMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, no. 4-5, pp. 23-28. (In Russ.)]
8. Тებლოева Л.М., Гусева О.А., Филиппов С.В., Хайдуков С.В. Активация и дифференцировка моноцитов периферической крови при пародонтите // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 2. С. 165-172. [Tebloeva L.M., Guseva O.A., Filippov S.V., Khajdukov S.V. Activation and differentiation of peripheral blood monocytes in periodontitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 2, pp. 165-172. (In Russ.)]

9. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khajdukov S.V., Bajdun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology «Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers» (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)]
10. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GAOTAR-Media, 2010. 752 p.
11. Abern M.R., Scosyrev E., Tsvian M., Messing E.M., Polascik T.J., Dudek A.Z. Survival of patients undergoing cytoreductive surgery for metastatic renal cell carcinoma in the targeted-therapy era. *Anticancer Res.*, 2014, Vol. 34, no. 5, pp. 2405-2411.
12. Appleby L.J., Nausch N., Midzi N., Mduluzi T., Allen J.E., Mutapi F. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol. Lett.*, 2013, Vol. 152, no. 1, pp. 32-41.
13. Becze E. Stress and inflammation combine to fuel cancer growth. *ONS Connect.*, 2014, Vol. 29, no. 4, pp. 30-31.
14. Demaret J., Walencik A., Jacob M.C., Timsit J.F., Venet F., Lepape A., Monneret G. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2013, Vol. 84, no. 1, pp. 59-62.
15. Farkas A., Kemény L. Monocyte-derived interferon-alpha primed dendritic cells in the pathogenesis of psoriasis: new pieces in the puzzle. *Int. Immunopharmacol.*, 2012, Vol. 13, no. 2, pp. 215-218.
16. Gao Y., Huang D. The value of the systematic inflammation-based Glasgow Prognostic Score in patients with gastric cancer: A literature review. *J. Cancer Res. Ther.*, 2014, Vol. 10, no. 4, pp. 799-804.
17. Gordon S. Targeting a monocyte subset to reduce inflammation. *Circ. Res.*, 2012, Vol. 110, no. 12, pp. 1546-1548.
18. Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. *J. Immunol. Methods*, 2012, Vol. 381, no. 1-2, pp. 9-13.
19. Ishizuka M., Oyama Y., Abe A., Tago K., Tanaka G., Kubota K. Clinical Significance of an Inflammation-based Prognostic System for Gastric Cancer Patients with a Preoperative Normal Serum Level of Carcinoembryonic Antigen. *Anticancer Res.*, 2014, Vol. 34, no. 12, pp. 7219-7226.
20. Langlet C., Tamoutounour S., Henri S., Luche H., Ardouin L., Grégoire C., Malissen B., Guillemins M. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 4, pp. 1751-1760.
21. Lauvau G., Chorro L., Spaulding E., Soudja S.M. Inflammatory monocyte effector mechanisms. *Cell Immunol.*, 2014, Vol. 291, no. 1-2, pp. 32-40.
22. Li Y., Lee P.Y., Kellner E.S., Paulus M., Switanek J., Xu Y., Zhuang H., Sobel E.S., Segal M.S., Satoh M., Reeves W.H. Monocyte surface expression of FcγRI (CD64), a biomarker reflecting type-I interferon levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, no. 3, p. 90.
23. Luijckx J.I., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Lab. Hematol.*, 2004, Vol. 10, pp. 102-108.
24. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
25. Mancardi D.A., Albanesi M., Jönsson F., Iannascoli B., van Rooijen N., Kang X., England P., Daëron M., Bruhns P. The high-affinity human IgG receptor FcγRI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 9, pp. 1563-1573.
26. Monneret G., Venet F. Monocyte HLA-DR in sepsis: shall we stop following the flow? *Crit. Care*, 2014, Vol. 18, no. 1, pp. 102.
27. Nocca G., De Sole P., Gambarini G., De Palma F., Parziale V., Giardina B., Lupi A. Alteration of monocytic cell oxidative burst caused by methacrylic monomers present in dental materials: a chemiluminescence study. *Luminescence*, 2006, Vol. 21, no. 3, pp. 202-206.
28. Qu C., Brinck-Jensen N.S., Zang M., Chen K. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int. J. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 19, pp. 1-5.
29. Serbina N.V., Shi C., Pamer E.G. Monocyte-mediated immune defense against murine *Listeria monocytogenes* infection. *Adv. Immunol.*, 2012, Vol. 113, pp. 119-134.
30. Shi C., Pamer E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 11, pp. 762-774.
31. Skrzeczyńska-Moncznik J., Bzowska M., Loseke S., Grage-Griebenow E., Zembala M., Pryjma J. Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2008, Vol. 67, no. 2, pp. 152-159.

32. Stec M., Baran J., Baj-Krzyworzeka M., Weglarczyk K., Gozdzik J., Siedlar M., Zembala M. Chemokine receptors and chemokine production by CD34<sup>+</sup> stem cell-derived monocytes in response to cancer cells. *Anticancer Res.*, 2012, Vol. 32, no. 11, pp. 4749-4753.

33. Strehl C., Fangradt M., Fearon U., Gaber T., Buttgerit F., Veale D.J. Hypoxia: how does the monocyte-macrophage system respond to changes in oxygen availability? *J. Leukoc. Biol.*, 2014, Vol. 95, no. 2, pp. 233-241.

34. Tallone T., Turconi G., Soldati G., Pedrazzini G., Moccetti T., Vassalli G. Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, 2011, Vol. 4, no. 2, pp. 211-219.

35. Tolouei Semnani R., Moore V., Bennuru S., McDonald-Fleming R., Ganesan S., Cotton R., Anuradha R., Babu S., Nutman T.B. Human monocyte subsets at homeostasis and their perturbation in numbers and function in filarial infection. *Infect. Immun.*, 2014, Vol. 82, no. 11, pp. 4438-4446.

36. Zhan Y., Wu L. Functional regulation of monocyte-derived dendritic cells by microRNAs. *Protein Cell*, 2012, Vol. 3, no. 7, pp. 497-507.

37. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol.*, 2014, Vol. 289, no. 1-2, pp. 135-139.

38. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 16, pp. 74-80.

---

**Авторы:**

**Савченко А.А.** — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории, ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск, Россия

**Борисов А.Г.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск, Россия

**Модестов А.А.** — к.м.н., главный врач КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского», г. Красноярск, Россия

**Мошев А.В.** — аспирант ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск, Россия

**Кудрявцев И.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург; ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Тоначева О.Г.** — заведующая отделением, врач-онколог КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского», г. Красноярск, Россия

**Кощеев В.Н.** — аспирант ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск, Россия

**Authors:**

**Savchenko A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory, Research Institute for Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Borisov A.G.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute for Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Modestov A.A.**, PhD (Medicine), Chief Physician, Krasnoyarsk A.I. Kryzhanovsky Regional Clinical Oncology Center, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Moshev A.V.**, Postgraduate Student, Research Institute for Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biologie), Senior Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Tonacheva O.G.**, Head of Department, Oncologist, Krasnoyarsk A.I. Kryzhanovsky Regional Clinical Oncology Center, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Koshcheev V.N.**, Postgraduate Student Research Institute for Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

---

Поступила 07.02.2015  
Принята к печати 16.02.2015

Received 07.02.2015  
Accepted 16.02.2015