

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ЛЮМИНОЛ- И ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ В ДИНАМИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Куртасова Л.М.¹, Семенов Э.В.¹, Зуков Р.А.¹, Шкапова Е.А.²

¹ ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

² КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского», г. Красноярск, Россия

Резюме. Цель исследования — изучение параметров люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов периферической крови у больных раком мочевого пузыря (РМП) до операции и после хирургического лечения.

Проведены наблюдения за больными мышечно-инвазивным РМП в период до операции (n = 60) и через 10 дней после хирургического лечения (n = 46) в возрасте 45–55 лет. Контрольную группу составили 56 здоровых доноров. Люминол- и люцигенин-зависимую ХЛ нейтрофилов крови оценивали методом De Sole et al. (1983).

У больных РМП в нейтрофилах периферической крови выявили изменения в системе продукции активных форм кислорода (АФК) как на начальном этапе окислительных реакций, так и на уровне суммарной активности кислородных радикалов. Установили нарушения внутриклеточного соотношения первичных и вторичных АФК.

Выявленные у больных РМП изменения окислительного метаболизма в нейтрофилах крови, играющего важную роль в реализации эффекторного потенциала клетки, могут повлиять на развитие полноценного цитопатического эффекта нейтрофильными гранулоцитами.

Ключевые слова: хемилюминесценция, нейтрофилы, рак мочевого пузыря

Адрес для переписки:

Куртасова Людмила Михайловна
ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: 8 (391) 220-06-28.
Факс: 8 (391) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozenie@yandex.ru

Address for correspondence:

Kurtasova Lyudmila M.
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of the Russian Federation
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak str., 1.
Phone: 7 (391) 220-06-28.
Fax: 7 (391) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozenie@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.М. Куртасова., Э.В. Семенов, Р.А. Зуков, Е.А. Шкапова, «Изменение параметров люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у больных раком мочевого пузыря в динамике заболевания» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2. С. 173–178. doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-173-178

For citation:

L.M. Kurtasova, E.V. Semenov, R.A. Zukov, E.A. Shkapova, “Changes in parameters of luminol-dependent and lucigenin-dependent chemiluminescence of peripheral blood neutrophils in patients with bladder cancer in the disease dynamics”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 173–178. doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-173-178

© Куртасова Л.М. и соавт., 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-173-178>

CHANGES IN PARAMETERS OF LUMINOL-DEPENDENT AND LUCIGENIN-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER IN THE DISEASE DYNAMICS

Kurtasova L.M.^a, Semenov E.V.^a, Zukov R.A.^a, Shkapova E.A.^b

^a Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Center named after A.I. Kryzhanovsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The study deals with parameters of luminol-dependent and lucigenin-dependent chemiluminescence (CL) of peripheral blood neutrophils from patients with bladder cancer (BC) prior to surgical treatment.

We examined sixty patients (45 to 55 years old) with advanced bladder cancer (TNM) prior to the operation, and forty-six patients at 10 days after surgical treatment. A control group consisted of 56 healthy donors. Luminol-dependent and lucigenin-dependent chemiluminescence of blood neutrophils was assessed according to De Sole et al. (1983).

Chemiluminescence assays of peripheral blood neutrophils from the patients with bladder cancer revealed changes in production of reactive oxygen species (ROS), both for initial stage of oxidation reaction, and total level of active oxygen radicals. We have found disturbed values of primary-to-secondary ROS ratio in the cells.

In the patients with bladder cancer, some changes in oxidative metabolism of the blood neutrophils have been registered. These alterations may play an important role in promotion of potential effector cell functions, thus, probably, affecting the whole-scale development of a cytopathic effect exerted by neutrophilic granulocytes.

Keywords: chemiluminescence, neutrophils, bladder cancer

Введение

В настоящее время известна способность нейтрофильных гранулоцитов к выраженному цитотоксическому действию на опухолевые клетки, что отражает один из механизмов обеспечения противоопухолевой резистентности организма [3, 6]. Следует отметить, что цитопатическое действие нейтрофилов, главным образом, связано с генерацией активных форм кислорода [2, 3, 7, 8].

Первичным метаболитом активированного кислорода является супероксидный анион-радикал (O_2^-), из которого берет начало весь каскад активных форм кислорода (АФК). В качестве основных вторичных АФК можно выделить гипохлорную кислоту ($HOCl$), хлорамины и продукты перекисного окисления липидов [1, 2]. Для оценки интенсивности продукции активных форм кислорода используют хемилюминесцентное свечение, которое усиливают добавлением люминофоров, вступающих в реакцию с АФК [1].

Известно, что люцигенин окисляется под влиянием преимущественно супероксидного аниона и опосредованно отражает активность НАДФ(Н)-оксидазы. В свою очередь люминол-

зависимая хемилюминесценция формируется в системе миелопероксидазы и отражает суммарную активность кислородных и других радикалов (с акцентом на синглетный кислород и гидроксильный радикал) [4, 7, 8, 9].

Следовательно, изучение параметров люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов позволит выявить механизмы нарушений кислородзависимого метаболизма, которые, как известно, играют важную роль в реализации эффекторного потенциала клеток.

Учитывая вышеизложенное, целью исследования явилось изучение параметров люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у больных раком мочевого пузыря до операции и после хирургического лечения.

Материалы и методы

На базе урологического отделения Красноярского краевого клинического онкологического диспансера методом случайной выборки (по мере поступления в стационар) были отобраны 60 больных с диагнозом мышечно-инвазивный рак

мочевого пузыря (РМП) в возрастном диапазоне 45–55 лет в период до операции, 46 из них составили группу наблюдения через 10 дней после хирургического лечения. Контрольную группу составили 56 здоровых доноров.

Люминол- и люцигенин-зависимую ХЛ нейтрофилов периферической крови оценивали методом De Sole et al. [5] на биохемилюминесцентном анализаторе CL 3606 М (Россия). Определяли следующие параметры: время выхода на максимум ($T_{\max}$), максимальное значение свечения ($I_{\max}$) и площадь под ХЛ кривой (S). В качестве индуктора «дыхательного взрыва» использовали опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл («Sigma» США). Усиление ХЛ, индуцированной зимозином, относительно спонтанной ХЛ оценивали при помощи соотношения $S_{\text{зимозан}}/S_{\text{спонтанная}}$ и определяли как индекс активации.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием пакета прикладных программ STATISTICA v. 8.0 (Stat Soft, Inc., США). Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены медианой (Me) и интерквартильным размахом в виде 25 и 75 перцентилей (Q_{25} ; Q_{75}).

Статистическая достоверность исследуемых показателей в независимых выборках проанализирована с помощью критерия Манна–Уитни. Для выборок с попарно связанными вариантами применяли критерий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ показателей люминол-зависимой ХЛ у больных РМП в период до хирургического лечения показал замедленное время выхода на максимум свечения спонтанной ХЛ нейтрофилов периферической крови по сравнению с величинами контрольной группы (табл. 1).

Параметры индуцированной опсонизированным зимозаном ХЛ реакции нейтрофилов крови характеризовались удлинением времени реагирования на стимул, повышением интенсивности свечения и увеличением площади под ХЛ кривой относительно показателей группы контроля (табл. 1). Кроме того, установлено, что величина индекса активации в 1,68 раза ($p < 0,05$) превышала соответствующий показатель контрольной группы.

ТАБЛИЦА 1. ЛЮМИНОЛ- И ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ДО ОПЕРАЦИИ (Me ; Q_{25} – Q_{75})

Показатель	Контрольная группа		Больные РМП	
	Люминол-зависимая ХЛ ($n = 56$) 1	Люцигенин-зависимая ХЛ ($n = 56$) 2	Люминол-зависимая ХЛ ($n = 60$) 3	Люцигенин-зависимая ХЛ ($n = 60$) 4
Спонтанная хемилюминесценция				
$T_{\max}$, сек.	505,50 208,50-1502,50	1989,00 1624,00-2440,00	1692,00 1117,00-2110,00	2171,00 1872,00-2472,00
$I_{\max}$, о.е. $\times 10^3$	6,67 3,04-18,70	1,22 0,79-8,99	7,08 2,99-17,13	9,12 2,36-14,56 $p_2 < 0,01$
S_1 , о.е. $\times 10^5$	2,06 1,23-4,60	0,57 0,36-1,93	2,18 0,85-12,45	2,51 0,51-6,31 $p_2 < 0,05$
Индуцированная хемилюминесценция				
$T_{\max}$, сек.	1270,00 862,00-1779,00	1799,00 719,00-2525,00	1925,00 11431,00-2079,00	1540,00 824,00-2138,00
$I_{\max}$, о.е. $\times 10^3$	10,54 4,98-41,70	1,94 1,10-6,53	24,15 17,11-42,77 $p_1 < 0,05$	10,76 5,50-22,81 $p_2 < 0,01$
S_2 , о.е. $\times 10^5$	3,78 1,53-9,40	0,78 0,53-3,21	8,25 3,31-18,80 $p_1 < 0,05$	3,30 1,40-7,00 $p_2 < 0,05$
S_2/S_1	1,87 1,52-3,00	1,65 1,05-1,75	3,14 2,24-4,59 $p_1 < 0,05$	1,98 1,37-2,23

Примечание. p – статистически значимые различия. РМП – рак мочевого пузыря; ХЛ – хемилюминесценция.

Изучение параметров люминол-зависимой ХЛ нейтрофилов крови у больных РМП в период через 10 дней после хирургического лечения выявило замедленный выход на максимум интенсивности свечения спонтанной ХЛ, повышение максимума «дыхательной вспышки» и увеличение площади под хемилюминесцентной кривой по сравнению с величинами контрольной группы (табл. 2). При индукции опсонизированным зимозаном отмечено повышение в 2,25 раза ($p < 0,05$) интенсивности свечения и увеличение в 1,38 раза ($p < 0,05$) площади под индуцированной ХЛ кривой относительно показателей контроля (табл. 2).

Исследование параметров люцигенин-зависимого ХЛ ответа нейтрофилов периферической крови у больных РМП в период до хирургического лечения обнаружило увеличение в 7,47 раза ($p < 0,01$) величины максимума «дыхательной вспышки» и в 4,40 раза ($p < 0,05$) площади под спонтанной ХЛ кривой по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы (табл. 1).

После стимуляции нейтрофилов крови опсонизированным зимозаном выявлено повышение в 5,55 раза ($p < 0,01$) интенсивности свечения и увеличение в 4,23 раза ($p < 0,05$) площади под стимулированной ХЛ кривой относительно параметров группы контроля (табл. 1).

Оценка показателей люцигенин-зависимой ХЛ нейтрофилов крови у больных РМП через 10 дней после операции позволила установить повышение интенсивности «дыхательной вспышки» как спонтанной, так и индуцированной зимозаном ХЛ, а также увеличение площади под спонтанной и стимулированной ХЛ кривой по сравнению с параметрами контрольной группы (табл. 2).

Таким образом, у больных РМП в период до хирургического лечения наблюдается изменение кинетики спонтанного люминол-зависимого ХЛ ответа нейтрофилов периферической крови и отмечается повышенный уровень фоновой люцигенин-зависимой ХЛ.

В то же время при индукции опсонизированным зимозаном уровень максимальной интенсивности свечения и общее количество активных

ТАБЛИЦА 2. ЛЮМИНОЛ- И ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ (Me; Q₂₅-Q₇₅)

Показатель	Контрольная группа		Больные РМП	
	Люминол-зависимая ХЛ (n = 56) 1	Люцигенин-зависимая ХЛ (n = 56) 2	Люминол-зависимая ХЛ (n = 46) 3	Люцигенин-зависимая ХЛ (n = 46) 4
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	505,50 208,50-1502,50	1989,00 1624,00-2440,00	1439,00 673,50-2027,00 $p_1 < 0,05$	2142,00 1318,00-2206,00
Imax, о.е. $\times 10^3$	6,67 3,04-18,70	1,22 0,79-8,99	14,92 8,30-31,04 $p_1 < 0,05$	14,50 4,37-33,37 $p_2 < 0,05$
S ₁ , о.е. $\times 10^5$	2,06 1,23-4,60	0,57 0,36-1,93	5,03 1,58-11,89 $p_1 < 0,05$	4,18 0,66-9,93 $p_2 < 0,01$
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	1270,00 862,00-1779,00	1799,00 719,00-2525,00	1663,50 1284,50-1793,50	1871,50 1378,00-2111,00
Imax, о.е. $\times 10^3$	10,54 4,98-41,70	1,94 1,10-6,53	23,76 10,45-61,06 $p_1 < 0,05$	23,48 5,34-30,86 $p_2 < 0,05$
S ₂ , о.е. $\times 10^5$	3,78 1,53-9,40	0,78 0,53-3,21	5,22 1,75-49,88 $p_1 < 0,05$	4,27 1,27-19,70 $p_2 < 0,05$
S ₂ /S ₁	1,87 1,52-3,00	1,65 1,05-1,75	1,92 1,22-3,03	1,72 0,97-1,92

Примечание. p – статистически значимые различия. РМП – рак мочевого пузыря; ХЛ – хемилюминесценция.

супероксидных анионов в несколько раз меньше, чем соответствующие параметры, отражающие активность продукции вторичных АФК.

Кроме того, у больных РМП в дооперационном периоде повышена способность нейтрофилов крови к усилению выработки вторичных АФК в ответ на стимуляцию *in vitro*, о чем свидетельствует индекс активации клеток в тесте с люминолом. При этом увеличение уровня продукции вторичных АФК может привести к перекисному окислению липидов клеточных мембран и отразиться на функциональном состоянии клеток.

В период через 10 дней после хирургического лечения у больных РМП сохраняются изменения кинетики спонтанного люминол-зависимого ХЛ ответа нейтрофилов крови и определяются высокие уровни спонтанной продукции первичных и вторичных АФК.

В ходе индуцированной ХЛ реакции наблюдается сохранение высокого уровня продукции как супероксидных радикалов, так и вторичных АФК.

Относительные показатели, характеризующие продукцию первичных и вторичных АФК нейтрофилами крови при стимуляции зимозаном *in vitro*, демонстрируют, что при люминол- и люцигенин-зависимой ХЛ максимальная интенсивность свечения увеличивается относительно спонтанной на 59,24% и 61,93% соответственно, а общее количество активных кислородных радикалов остается практически неизменным и соответствует уровню спонтанной продукции первичных ($4,27 \times 10^5$; $4,18 \times 10^5$ соответственно)

и вторичных ($5,22 \times 10^5$; $5,03 \times 10^5$ соответственно) АФК.

Соотношение первичных и вторичных АФК в стимулированных *in vitro* нейтрофилах крови у больных РМП в данный период наблюдения составляет 1:1. Это отражает дисбаланс механизмов, регулирующих продукцию первичных и вторичных высокоэнергетических кислородных метаболитов.

Величина индексов активации нейтрофилов крови у больных РМП через 10 дней после хирургического лечения свидетельствует о сохраненных компенсаторных метаболических возможностях АФК-продуцирующих систем клетки, причем как в начале цепи преобразования активных радикалов, так и на этапе суммарного эффекта.

Заключение

Результаты проведенного исследования выявили у больных РМП изменения кислородозависимого метаболизма в нейтрофилах периферической крови в период до операции и через 10 дней после хирургического лечения. Изменения зарегистрированы не только на начальном этапе окислительных реакций, но и на уровне продукции вторичных АФК. Нарушено соотношение первичных и вторичных высокоэнергетических внутриклеточных оксидантов, что не может не повлиять на развитие полноценного цитопатического эффекта нейтрофилов в отношении как микроорганизмов, так и опухолевых клеток.

Список литературы / References

1. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии, 2009. Т. 49. С. 341-388. [Vladimirov Yu.A., Proskurina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances Biological Chemistry*, 2009, Vol. 49, pp. 341-388. [In Russ.]]
2. Коленчукова О.А., Савченко А.А., Смирнова С.В. Особенности люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 4-5. С. 437-440. [Kolenchukova O.A., Savchenko A.A., Smirnova S.V. Features of luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophilic granulocytes in patients with chronic rhinosinusitis. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 4-5, pp. 437-440. [In Russ.]]
3. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евглевский А.А. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты // Иммунология, 2012. № 5. С. 281-287. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Yevglevsky A.A. The dual role of neutrophilic granulocytes in the realization anti-tumor protection. *Immunologiya = Immunology*, 2012, no. 5, pp. 281-287. [In Russ.]]
4. Benbarek H., Ayad A., Deby-Dupont G., Boukraa L., Serteyn D. Modulatory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of equine neutrophils. *Vet. Res. Commun.*, 2012, Vol. 36, no. 1, pp. 29-33.
5. De Sole P., Lippa S., Lixxarru G. Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to access oxygen-dependent microbial activity of granulocytes. *J. Clin. Lab. Autom.*, 1983, Vol. 3, pp. 391-400.
6. Di Carbo E., Forni G., Musiani P. Neutrophils in the antitumoral immune response. *Chem. Immunol. Allergy*, 2003, Vol. 83, pp. 182-286.

7. Kubota K., Saiwai H., Kumamaru H., Maeda T., Ohkawa Y., Aratani Y., Nagano T., Iwamoto Y., Okada S. Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury. *Spine*, 2012, Vol. 37, no. 16, pp. 1363-1369.
8. Marcoux J., Man P., Petit-Haertlein I., Vives C., Forest E., Fieschi F. P47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex. *J. Biol. Chem.*, 2010, Vol. 285, no. 37, pp. 28980-28990.
9. Seth R., Ribeiro M., Romaschin A., Scott J.A., Manno M., Scott J.A., Liss G.M., Tarlo S.M. Occupational endotoxin exposure and a novel luminol-enhanced chemiluminescence assay of nasal lavage neutrophil activation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 127, no. 1, pp. 272-275.

Авторы:

Куртасова Л.М. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Семенов Э.В. — аспирант кафедры онкологии и лучевой терапии с курсом ПО ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Зуков Р.А. — к.м.н., доцент, заведующий кафедрой онкологии и лучевой терапии с курсом ПО ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Шкапова Е.А. — к.б.н., врач клинико-лабораторной диагностики КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского», г. Красноярск, Россия

Authors:

Kurtasova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation

Semenov E.V., PhD Candidate, Department of Oncology and Radiotherapy with Course of Postgraduate Education, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation

Zukov R.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Chief, Department of Oncology and Radiotherapy with Course of Postgraduate Education, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation

Shkapova E.A., PhD (Biology), Doctor in Clinical Laboratory Diagnostics, Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Center named after A.I. Kryzhanovskiy, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 30.01.2015
Принята к печати 16.02.2015

Received 30.01.2015
Accepted 16.02.2015