

## ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ МИЕЛОМНОЙ БОЛЕЗНЬЮ G-ФОРМЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Смирнова О.В., Манчук В.Т., Агилова Ю.Н.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Целью работы явилось изучение особенностей функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови больных ММ G-формы, в зависимости от стадии заболевания. При этом оценивались следующие параметры: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции, максимальное значение интенсивности хемилюминесценции, площадь кривой хемилюминесценции. Для усиления «респираторного взрыва» добавляли люминол, а индуктором служил зимозан. Усиление хемилюминесценции оценивали по соотношению площади индуцированной к площади спонтанной хемилюминесценции и обозначали индексом активации. Возникновение и прогрессирование ММ в организме человека сопровождается нарушением функциональных свойств нейтрофилов. У больных ММ на II и III стадии достоверно выше показатели спонтанной продукции АФК относительно контроля. Индуцируемая продукция АФК нейтрофилами также повышается во всех исследуемых группах относительно спонтанной продукции и контрольных параметров, что доказывает роль нейтрофильных гранулоцитов не только как клеток первой линии неспецифической противомикробной защиты, но и как цитотоксических эффекторов на опухолевые клетки.

**Ключевые слова:** множественная миелома, нейтрофильные гранулоциты, хемилюминесценция

## CHARACTERISTICS OF NEUTROPHIL CHEMILUMINESCENCE IN PATIENTS WITH TYPE G MULTIPLE MYELOMA AT DIFFERENT STAGES OF THE DISEASE

Smirnova O.V., Manchuk V.T., Agilova Yu.N.

*Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

**Abstract.** The aim of present work was to study some activation features of neutrophilic granulocytes from peripheral blood of the patients with G type of multiple myeloma (MM), as depending on clinical

### Адрес для переписки:

Смирнова Ольга Валентиновна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
медицинских проблем Севера» СО РАМН  
660022, Россия, г. Красноярск,  
ул. Партизана Железняка, 3г.  
Тел.: 8 (913) 567-97-19.  
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

### Address for correspondence:

Smirnova Olga V.  
Research Institute for Medical Problems of the North, Siberian  
Branch, Russian Academy of Medical Sciences  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan  
Zhelesnyak str., 3g.  
Phone: 7 (913) 567-97-19.  
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

### Образец цитирования:

О.В. Смирнова, В.Т. Манчук, Ю.Н. Агилова, «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.  
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-579-584

### For citation:

O.V. Smirnova, V.T. Manchuk, Yu.N. Agilova, "Characteristics of neutrophil chemiluminescence in patients with type G multiple myeloma at different stages of the disease", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 579-584. doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-579-584

stage of the disorder. In this study, a number of parameters were evaluated, as follows: time dynamics of the up-to-maximum luminescence increase; maximal luminescence levels, areas under the curves (AUC) for the dynamic luminescence registration. Zymosan was used as chemiluminescence inducer, and luminol, as enhancer of the “respiratory burst”. The chemiluminescence enhancement was assessed as a ratio of AUC values corresponding to induced-to-spontaneous chemiluminescence being denoted as an ‘activation index’. The onset and progression of MM in humans was accompanied by disturbance of neutrophil functions. MM patients at stage II and III exhibited a significant increase of spontaneous ROS production relative to controls. The inducible ROS production by neutrophils was also increased in all groups, as compared with spontaneous production and control parameters, thus arguing for a distinct role of neutrophils, as potentially cytotoxic effectors against tumor cells, along with their basic function of nonspecific antimicrobial protection.

*Keywords: multiple myeloma, neutrophilic granulocytes, chemiluminescence*

## Введение

Множественная миелома (ММ) — хронический гемобластоз, субстратом которого являются атипичные плазматические клетки, синтезирующие парапротеин. В зависимости от класса производимого иммуноглобулина ММ делятся на G-миеломы (55-65% всех миелом), А-миеломы (20-25%), D-миеломы (2-5%), Е-миеломы и М-миеломы (0,5% случаев) [1]. ММ поражает чаще людей в пожилом возрасте, составляет 10% среди всех гемобластозов. Болезнь регистрируется во всех странах мира у людей всех рас, при этом частота ММ составляет в среднем 1,2-3,2 случая на 100 тысяч населения в год [1, 5].

В патогенезе ММ G-формы наблюдается бесконтрольный синтез моноклонального парапротеина класса IgG, который инфильтрирует красный костный мозг, костную ткань, почки, формируя клиническую картину распространенного заболевания.

В последние годы наблюдается тенденция к увеличению случаев заболеваний ММ, а также наблюдается абсолютный рост госпитализаций [6]. Одним из факторов, обуславливающим развитие онкологического заболевания, является снижение реактивности иммунной системы. Иммунодефицитное состояние организма определяет развитие злокачественной опухоли, при этом сама опухоль способствует развитию и пролонгации иммунной супрессии [2]. Нейтрофильные гранулоциты занимают одну из наиболее важных позиций в гуморально-клеточном иммунитете. Являясь клетками первой линии неспецифической противомикробной защиты, активно

участвуют в воспалении, являясь не только фагоцитами, но и эффекторами каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления, обладают цитотоксическим действием на опухолевые клетки, способствуя противоопухолевой резистентности организма. Особенности функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов влияют на иммунологическую защиту организма в целом. При гемобластозах наблюдаются нарушения в системе клеточно-гуморального иммунитета [3, 4], способствующие возникновению и развитию инфекционных осложнений. При ММ инфекционные заболевания занимают второе место и встречаются у большинства больных. В связи с этим **целью нашей работы** явилось изучение особенностей функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови больных ММ G-формы, в зависимости от стадии развития заболевания.

## Материалы и методы

Отбор больных для исследования осуществлялся методом случайной выборки по мере госпитализации в гематологическое отделение Краевой клинической больницы № 1 г. Красноярска в период с 2011 по 2012 г. При поступлении врачами гематологами у больных собирался анамнез и анализировались данные объективно-го осмотра, отражающие их общее состояние.

Больных ММ дифференцировали по стадиям заболевания согласно Международной классификации — International Staging System (ISS) (2005 г.). Данная классификация основана на линейной зависимости между содержа-

нием М-белка и клеточной опухолевой массой у больных. При ММ II стадии происходит нарастание массы опухоли, характерны следующие показатели: уровень гемоглобина (Hb) – 85-100 г/л, IgG – 50-70 г/л. При ММ III стадии наблюдается увеличение массы опухоли, характерны гиперкальциемия, остеолитические процессы и следующие показатели: Hb < 85 г/л, IgG > 70 г/л.

Среди 100 обследованных больных ММ – мужчин 38%, женщин 62%. Средний возраст мужчин составлял 60 лет  $\pm 2,3$  года (от 47 до 73 лет), женщин – 61 год  $\pm 3,7$  года (от 43 до 76 лет). У 85% человек регистрировались те или иные инфекционные осложнения при поступлении.

Контрольную группу составили 100 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с группой обследованных больных. Всем больным венозная кровь бралась

утром натощак из локтевой вены в пробирки с гепарином, при поступлении в стационар, до назначения патогенетической терапии.

Обследование больных и практически здоровых добровольцев проводилось с разрешения этического комитета ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, при этом каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование.

В качестве метода изучения использовался хемилюминесцентный анализ спонтанной и индуцированной продукции активных форм кислорода (АФК) нейтрофильными гранулоцитами больных ММ в зависимости от стадии заболевания (De Sole P. et al., 1983). Оценку спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL 3606» (Россия). Регистрация результатов и управление анализатором

**ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ММ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

Показатели	Контроль, N = 118 (1)		Стадия II, N = 65 (2)		Стадия III, N = 35 (3)	
	Me	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Me	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Me	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>
Tmax спонтанная	975	211-1510	884	564-1366	752	444-1374
Imax спонтанная	7720	3000-19000	23270	7630-53232	26500	1572-51480
			p <sub>1</sub> < 0,001		p <sub>1</sub> < 0,021	
Sqr спонтанная (*10 <sup>6</sup> )	0,22	0,15-0,54	3,2	0,37-6,1	2,3	0,14-3,7
			p <sub>1</sub> < 0,001		p <sub>1</sub> < 0,001	
Tmax индуцированная	1102,5	872-1800	1060	733-1819	1020	769-1407
Imax индуцированная	17270	8000-42840	56584	23973-99928	49312	915-102201
			p <sub>1</sub> < 0,001		p <sub>1</sub> < 0,001	
Sqr индуцированная (*10 <sup>6</sup> )	0,4	0,15-0,95	7,17	1,2-10,6	5,4	0,11-8,09
			p <sub>1</sub> < 0,001		p <sub>1</sub> < 0,003	
Индекс активации	1,3	0,9-2,0	2	3-1	2	1,2-2
			p <sub>1</sub> < 0,007			

**Примечание.** p<sub>1</sub> – статистически достоверные различия с величиной контрольных показателей; p<sub>2</sub> – --/- с величиной показателей больных ММ.

осуществлялись через персональный компьютер. Определялись следующие характеристики: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции ( $T_{max}$ ), максимальное значение интенсивности хемилюминесценции ( $I_{max}$ ), площадь кривой хемилюминесценции ( $S$ ). В качестве усилителя хемилюминесценции использовали люминол. Индуктором респираторного взрыва служил опсонизированный зимозан. Усиление хемилюминесценции, индуцированной опсонизированным зимозаном, оценивали по соотношению площади индуцированной ( $S_{инд}$ ) к площади спонтанной ( $S_{спонт}$ ) хемилюминесценции и обозначали индексом активации. По результатам проведенных исследований в пакете электронных таблиц MS Excel была сформирована база данных, на основе которой с помощью прикладных программ Statistica 8,0 производился статистический анализ. Вычислялись медиана ( $Me$ ) и персентили ( $Q_{25}$ – $Q_{75}$ ). Статистическую достоверность выборок производили с помощью критериев Манна–Уитни. Различия между группами считались статистически значимыми при  $p < 0,05$  [5]. Результаты статистической обработки сведены в таблице 1.

## Результаты и обсуждение

Люминол-зависимая хемилюминесценция формируется в системе миелопероксидазы и отражает суммарную активность кислородных и других радикалов.

Хемилюминесцентный анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, показал, что на II и III стадиях у больных ММ отмечается увеличение интенсивности хемилюминесценции приблизительно в 3,01 раза на II стадии и в 3,43 раза при III стадии заболевания по сравнению с контролем. Площадь кривой спонтанной хемилюминесценции у больных ММ увеличивалась в 14,54 раза на II стадии и в 10,45 раза на III стадии относительно контроля. При этом не было достоверных изменений в функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов на II и III стадиях заболевания. Особенности спонтанной хемилюминесцентной активности

нейтрофильных гранулоцитов при ММ, вероятно, обусловлены наличием злокачественного онкологического заболевания и инфекционными осложнениями, которые регистрировались у большинства больных.

После индукции хемилюминесцентного ответа опсонизированным зимозаном у больных ММ отмечалось увеличение интенсивности хемилюминесценции в 3,28 раза на II стадии, в 2,85 раза на III стадии относительно контроля, при этом в сравнении со спонтанной хемилюминесценцией регистрировалось усиление «свечения» в 2,43 раза на II стадии, и в 1,86 раза на III стадии. Площадь кривой индуцированной хемилюминесценции увеличивалась в 17,95 раза на II стадии и в 13,5 раза на III стадии по сравнению с контрольной группой. При этом в сравнении со спонтанной хемилюминесценцией площадь кривой индуцированной хемилюминесценции увеличивалась в 2,24 раза на II стадии и в 2,34 раза на III стадии.

Индекс активации у больных ММ при II стадии заболевания увеличивался в 1,54 раза относительно контрольной группы, что свидетельствует о несбалансированной работе нейтрофильных гранулоцитов.

Тем не менее хемилюминесцентный анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, характеризующий уровень продукции первичных и вторичных АФК у больных ММ, не показал достоверного изменения времени выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции на II и III стадиях заболевания относительно контроля.

Таким образом, на II стадии заболевания достоверно повышались показатели времени выхода кривой на максимум интенсивности и площади кривой при спонтанной и индуцированной хемилюминесценции и индекс активации по сравнению с контролем.

На III стадии заболевания выявляемые изменения были аналогичны, за исключением особенностей индекса активации.

При оценке неспецифического звена иммунитета у больных на II стадии ММ с инфекционными осложнениями происходят однонаправленные механизмы активации НГ. Статистически

значимо повышались показатели хемилюминесцентной активности как при спонтанной, так и при индуцированной хемилюминесценции — интенсивность хемилюминесценции, площадь кривой, а также индекс активации ( $p < 0,045$ ). Увеличенная индуцированная хемилюминесцентная активность обусловлена активным участием фагоцитов в противоопухолевой и противобактериальной защитах организма. На III стадии ММ происходят разнонаправленные механизмы активации НГ. Статистически значимо повышались показатели как при спонтанной, так и при индуцированной хемилюминесценции — интенсивность хемилюминесценции ( $p < 0,05$ ), площадь кривой ( $p < 0,45$ ), а также индекс активации ( $p < 0,45$ ), но показатели индуцированной хемилюминесценции НГ были статистически значимо ниже, чем при спонтанной ( $p < 0,05$ ).

## Заключение

Проведенные исследования показали, что развитие ММ в организме человека сопровождается изменением функциональных свойств периферических нейтрофильных гранулоцитов. По мере прогрессирования заболевания наблюдается увеличение спонтанной продукции АФК нейтрофилами. Так показатели спонтанной продукции АФК у больных ММ на II и III стадии достоверно выше показателей контрольной группы. Индуцируемая продукция АФК нейтрофилами повышается во всех исследуемых группах относительно спонтанной продукции и контрольных параметров, что доказывает роль нейтрофильных гранулоцитов не только как клеток первой линии неспецифической противомикробной защиты, но и как цитотоксических эффекторов на опухолевые клетки.

## Список литературы / References

1. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. М.: Медицина, 1985. 448 с. [Vorobiev A.I. Manual of Hematology]. Moscow: Medicine, 1985. 448 p.
2. Галактионов В.Г. Иммунология. М.: Изд-во МГУ, 1998. 458 с. [Galaktionov V.G. Immunology]. Moscow: Moscow State University Press, 1998. 458 p.
3. Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т. Хронические лейкозы клинические и иммунологические особенности возникновения и развития. Новосибирск: ГУП Академический научно-издательский производственно-полиграфический и книгораспространительский центр РАН "Издательство "Наука" Обособленное подразделение «Сибирская издательская фирма "Наука"», 2012. 127 с. [Smirnova O.V., Savchenko A.A., Manchuk V.T. Chronic leukemia clinical and immunological features of the emergence and development.] Novosibirsk: SUE Academic Scientific Publishing and printing production and Bookselling Center RAS "Publisher" Science "Separated subdivision" Siberian Publishing House «Nauka», 2012. 127 p.
4. Смирнова О.В., Титова Н.М., Елманова Н.Г. Роль прооксидантной системы в прогрессировании миеломной болезни // Врач-аспирант, 2013. Т. 60, № 5.1. С. 152-157. [Smirnova O.V., Titova N.M., Elmanova N.G. Prooxidant role in the progression of multiple myeloma. *Vrach-aspirant = Doctor-graduate Student*, 2013, Vol. 60, no. 5.1, pp. 152-157. (In Russ.)]
5. Статистика и проблемы гемобластозов / Василевский М.Г., Камарли З.П. // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета, Кыргызско-Российский Славянский университет, 2007. Т. 7, № 9. С. 84-89. [Statistics problems and Leukemia / Vasilevsky M.G., Kamarli Z.P. *Vestnik Kyrgyzsko-Rossyskogo Slavyanskogo universiteta. Kyrgyzsko-Rossiyskiy Slavyanskiy universitet = Bulletin of the Kyrgyz-Russian Slavic University, Kyrgyzko-Russian Slavic University*, 2007, Vol. 7, no. 9, pp. 84-89. (In Russ.)]

6. Федоров Г.Н., Леонов С.Д. Особенности хемилюминесценции цельной разведенной крови // Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал, 2007. Т. 6, вып. 4. [Fedorov G.N., Leonov S.D. Features chemiluminescence whole diluted blood. *Matematicheskaya morfologiya. Elektronnyy matematicheskiy i mediko-biologicheskiy zhurnal* = *Mathematical Morphology. Electronic Mathematical and Biomedical Journal*, 2007, Vol. 6, iss. 4. (In Russ.)]

---

**Авторы:**

**Смирнова О.В.** — д.м.н., руководитель лаборатории клинической патофизиологии и аллергологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск, Россия

**Манчук В.Т.** — д.м.н., член-корр. РАН, профессор, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

**Агилова Ю.Н.** — аспирант, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск, Россия

---

**Authors:**

**Smirnova O.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Pathophysiology and Allergy, Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Manchuk V.T.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director for Research, Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Agilova Yu.N.**, Postgraduate Student, Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

---

Поступила 03.10.2015  
Отправлена на доработку 19.03.2015  
Принята к печати 27.03.2015

---

Received 03.10.2015  
Revision received 19.03.2015  
Accepted 27.03.2015