

УДК 618-006:571-27

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ*

Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева

Ульяновский государственный университет

Для оценки неспецифического клеточного иммунитета использовали периферическую кровь 109 женщин при раке шейки матки Ia, Ib–IIa, IIb–IV стадий. При исследовании фагоцитарной активности выделенных из периферической крови нейтрофильных лейкоцитов, уровня миелопероксидазы и катионных белков, а также при определении доли активных нейтрофилов в спонтанном варианте НСТ-теста у больных по сравнению с донорами выявлено повышение абсолютного количества нейтрофилов при одновременном снижении в них исследуемых показателей на начальной стадии рака шейки матки. При распространении процесса количество нейтрофилов и их бактерицидная активность возрастают при сниженной фагоцитарной активности. При местнораспространенном раке шейки матки жесткость мембраны нейтрофилов возрастает.

Ключевые слова: рак шейки матки, нейтрофильные лейкоциты.

Введение. Онкогинекологические заболевания составляют значительную часть в общей структуре заболеваемости и смертности у женщин разных возрастных групп. Постоянным объектом изучения при этом являются рак шейки матки и яичников, так как они составляют 95 % всех злокачественных опухолей женских половых органов [5].

Частота развития рака шейки матки (РШМ) составляет 18,8 случая на 100 000 женского населения [24]. И если прирост заболеваемости РШМ за последние 5 лет в России составлял 0,9 случая на 100 000, то в Ульяновской области этот показатель достигал 6,1 случая на 100 000 женского населения [11].

Нейтрофильные лейкоциты (Нф) являются клеточным компонентом неспецифического иммунитета и неперенными участниками процесса формирования и развития опухоли. Они первыми мигрируют к опухоли на ранних стадиях ее формирования [24, 25], инфильтрируют ее и становятся компонентами стромы [22]. Данные о роли Нф в канцерогенезе противоречивы. Ряд работ свидетельствует о проопухолевой активности Нф [17, 26], в то время как существуют клинические и экспериментальные данные, подтверждаю-

щие цитостатическое и цитотоксическое действие Нф на клетки опухоли [16].

В организме Нф могут находиться в двух состояниях – исходном и активированном. Переход Нф из одного состояния в другое осуществляется через промежуточную стадию – прайминг [9], в ходе которого изменяется уровень клеточного метаболизма, в частности, увеличиваются цитотоксичность и бактерицидность микрофагов. Праймирование Нф может происходить под влиянием опухолевых клеток [18, 23].

Цель исследования. Оценка неспецифического клеточного иммунитета на разных стадиях рака шейки матки.

Материалы и методы. Объектом исследования послужили Нф периферической крови 109 первичных больных РШМ: Ia (начальный рак) – 1-я группа, Ib–IIa (местноограниченный рак) – 2-я группа, IIb–IV (распространенный рак) – 3-я группа (по классификации Международной федерации акушеров и гинекологов (FIGO)), подвергавшихся обследованию в гинекологическом отделении Ульяновского областного клинического онкологического диспансера. Контрольную группу составили практически здоровые женщины в возрасте 30–45 лет (n=45).

* Работа поддержана грантом Президента РФ и государственным заданием Минобрнауки РФ.

В Нф цитохимически определяли активность миелопероксидазы (МПО) с бензидином, уровень катионных белков (КБ) по М.Г. Шубичу, долю активных нейтрофилов (ДАН) в спонтанном варианте с восстановлением нейросинеготетразолия (НСТ-тест) по А.И. Карпищенко. Результаты выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Исследование фагоцитарной активности Нф проводили с использованием дрожжевых клеток. Рассчитывали фагоцитарный индекс по Гамбургеру (ФИ), фагоцитарное число по Райту (ФЧ) и индекс завершенности фагоцитоза.

Для оценки ригидности исследовали поверхность Нф на сканирующем зондовом микроскопе (СЗМ) Solver Pro (NT-MDT, Зеленоград) в полуконтактном режиме. Ригидность мембран оценивалась по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца.

Для определения значимости различий между группами использовали U-критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Рост опухоли в организме сопровождается изменением иммунного ответа, в частности, изменением количества и функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов как компонентов неспецифической резистентности. По мнению ряда авторов [15, 27], развитие злокачественной опухоли может сопровождаться увеличением нейтрофилов в периферической крови и увеличением миграции лейкоцитов в зону роста опухоли. Лейкоцитоз нейтрофильной природы отмечен у больных раком желудка, и его величина зависит от наличия и выраженности метастазирования [10]. По данным Н.В. Чердынцевой [12], наблюдается увеличение количества Нф у больных раком легкого III–IV стадии. У половины больных раком яичников (РЯ) отмечается увеличение относительного числа Нф в крови, у другой половины число Нф приближалось к верхней границе нормы [14]. По нашим данным, на I–II клинических стадиях при РЯ происходит снижение количества лейкоцитов в периферической крови и увеличение их на поздних стадиях, при этом количество Нф в крови значительно увеличивается на IV стадии прогрессирования РЯ [1].

В то же время существуют данные о снижении числа Нф в периферической крови и значительном нарушении их способности к адгезии у больных РЯ с асцитом [14].

В результате проведенных нами исследований установлено, что относительное количество Нф при прогрессировании РШМ статистически значимо увеличивается по сравнению с контролем ($61,7 \pm 2,91$ % в 1 группе, $65,9 \pm 2,25$ % во 2 группе и $72,4 \pm 1,88$ % в 3 группе против $55,9 \pm 4,40$ %). При этом абсолютное количество Нф в крови женщин при РШМ на Ia стадии снижается в 2 раза по сравнению с таковым у практически здоровых женщин ($3,5 \pm 0,52 \times 10^9$ /л против $6,4 \pm 0,68 \times 10^9$ /л) и статистически значимо повышается у женщин с распространенным процессом (до $7,1 \pm 1,47 \times 10^9$ /л).

По мнению ряда авторов, увеличение Нф в крови может свидетельствовать об усилении иммунной реакции в процессе развития опухоли [27]. Причиной нейтрофилии в циркулирующей крови может быть увеличение уровня гематопозитических факторов роста G-CSF или GM-CSF, которые также могут продуцироваться опухолевыми клетками [12], нарастание времени транзита Нф в крови [13] и укорочение времени пребывания их в костном мозге [10]. Повышение продукции простагландина E в процессе опухолевого роста также оказывает стимулирующее влияние на колониеобразующие единицы гранулоцитарно-макрофагального ростка [13].

В исследованиях В.С. Лавровой с соавт. [10] показано нарушение фагоцитарной активности Нф по отношению к стафилококку как на этапе поглощения, так и на стадии переваривания у животных с перевиваемыми злокачественными опухолями и химически индуцированными новообразованиями [10]. При исследовании фагоцитарной активности Нф по отношению к микробным тест-культурам разными авторами выявлено достоверное уменьшение поглотительной способности Нф у больных раком желудочно-кишечного тракта и других локализаций. Снижение переваривающей способности более выражено на поздних стадиях опухолевого роста и происходит раньше, чем угнетение поглощения [10]. У больных РЯ выявлено замедление фагоци-

тарной активности Нф периферической крови [14]. Имеются данные о неизменном ФИ Нф периферической крови больных РЯ на всех клинических стадиях при одновременном увеличении ФЧ по сравнению с донорами [1].

При оценке фагоцитарной активности было показано, что ФИ и ФЧ Нф 2-й группы

женщин с РШМ статистически значимо снижаются по сравнению с Нф контрольной группы. В Нф практически здоровых женщин и женщин 3 группы фагоцитоз идет по завершённому типу ($ИЗФ > 1$), в 1 и 2 группах, вероятно, по незавершённому типу, поскольку $ИЗФ < 1$ (табл. 1).

Таблица 1

Фагоцитарная активность Нф в динамике прогрессирования РШМ (M±m)

Показатели фагоцитоза	Здоровые женщины (контроль) n=45	1 группа n=40	2 группа n=38	3 группа n=31
ФИ, %	41,20±6,437	40,38±5,375	30,59±4,361*	35,14±5,931
ФЧ, усл. ед.	1,97±0,174	1,54±0,079	1,46±0,076*	1,48±0,141
ИЗФ, ед.	1,07	0,63	0,91	1,07
ОИП, ед.	–	78,17	74,11	75,13

Примечание. * – данные статистически значимо отличаются от аналогичных в группе контроля.

Снижение способности Нф фагоцитировать дрожжевые клетки может быть следствием переагруженности микрофагов фагоцитированным материалом (очевидно, остатками разрушенных опухолевых клеток). С этим связано истощение резервных возможностей Нф при раке [3]. Выявление нарушения фагоцитоза при раке может быть обусловлено различными причинами и связано с дефектностью рецепторного аппарата клеток, а также нарушением механизмов переваривания вследствие недостаточности внутриклеточных ферментативных систем Нф [14]. Сниженная фагоцитарная активность может быть связана с недостаточностью опсонизирующей активности сыворотки крови [15].

Непосредственная цитотоксическая активность Нф проявляется при активации секреторной дегрануляции – высвобождении протеолитических ферментов и других белков из гранул и меньших запасующих органелл [2]. У Нф имеются 4 типа гранул: азурофильные, содержащие МПО и относящиеся к регуляторно-секреторным гранулам; специфические гранулы, содержащие лактоферрин и коллагеназу; желатиназные и секреторные гранулы, возникающие на стадии зрелого Нф.

Азурофильные гранулы содержат нейтральные протеазы, в том числе МПО.

Именно эти гранулы мобилизуются при фагоцитозе и участвуют в образовании фаголизосом [6]. При оценке метаболизма Нф в исследованиях Н.М. Бережной и соавт. [3] выявлено снижение в них активности МПО в периферической крови больных раком легкого и прямой кишки [3]. При прогрессировании РЯ в Нф периферической крови уровень МПО снижается по сравнению с донорами [1]. По данным В.С. Лавровой с соавт. [10], у крыс с опухолью, индуцированной диметилбензантраценом (ДМБА), и у мышей со спонтанным раком молочной железы (РМЖ) имеет место снижение активности МПО в Нф периферической крови [10].

Уровень КБ характеризует кислороднезависимую бактерицидную систему Нф, способность к внутриклеточному и экстрацеллюлярному киллингу. КБ формируют водные каналы в мембранах, что приводит к лизису клетки. В ряде работ описано снижение содержания КБ Нф периферической крови у людей с разными локализациями злокачественного процесса и животных с опухолями [10].

Рядом авторов отмечено увеличение количества активных клеток в спонтанной НСТ-реакции у больных с неоплазмами [19]. При оценке функциональной активности Нф крови у больных раком желудка и легких III–IV стадии отмечено, что средние показатели

спонтанного НСТ-теста больных сравнимы по величине с контрольными значениями [15]. При миелолейкозе показатели НСТ-теста в Нф крови выше, чем у здоровых [4, 7]. По данным И.И. Антонеевой, средние значения НСТ-теста в группе доноров и в группе больных раком яичников на всех клинических стадиях заболевания сравнимы по величине. Добавление в качестве стимулятора *in vitro* опсонизированного зимозана приводило к существенному повышению процента форма-

занположительных Нф у доноров (в 2,1 раза) и у больных (1,9 раза) [1].

Результаты изучения ферментов кислородзависимой и анаэробной активности Нф здоровых женщин и женщин с РШМ представлены в табл. 2. Активность МПО Нф статистически значимо повышается при прогрессировании РШМ, а в спонтанном НСТ-тесте увеличивается количество активированных Нф у женщин 1-й группы (табл. 2).

Таблица 2

Показатели ферментов бактерицидной активности Нф (M±m)

Показатели фагоцитоза	Здоровые женщины (контроль) n=45	1 группа n=40	2 группа n=38	3 группа n=31
МПО, СЦК	1,56±0,169	2,05±0,139*	2,12±0,134*	2,24±0,117*
НСТ-тест	1,06±0,177	1,40±0,175*	0,99±0,186	1,06±0,114
КБ, СЦК	1,79±0,124	1,80±0,063	1,53±0,064	1,99±0,083

Примечание. * – данные статистически значимо отличаются от аналогичных в группе контроля.

Возрастание активности МПО может отражать как противораковую активность Нф, так и их неспецифическую стимуляцию при воспалительной реакции, сопровождающей канцерогенез [21].

Нашими исследованиями подтверждается увеличение в периферической крови больных РШМ на стадии Ia количества Нф, продуцирующих активные формы кислорода (АФК), что инициирует «всплеск» свободно-радикальных процессов. Это может привести к дестабилизации клеточных мембран самих Нф, а значит, нарушить распределение мембранных рецепторов, которые обеспечивают взаимодействие с клетками эндотелия сосудов. Это не позволяет создать полноценно функционирующий пул Нф в тканях.

С 1990-х гг. в биомедицинских исследованиях активно используется метод сканирующей зондовой микроскопии, который предоставил возможность изучать параметры клеток, не прибегая к длительной и сложной фиксации, тем самым минимально искажая получаемую информацию.

При получении изображения методом СЗМ общепризнанным методом фиксации является метод фиксации глутаровым альдегидом, поскольку при обработке им клетка сохраняет воду.

Методом СЗМ была исследована цитоархитектоника Нф и выяснено, что ригидность их мембраны при РШМ Ia и IIb–IV стадий значимо не отличается от таковой у Нф доноров (табл. 3).

Таблица 3

Ригидность нейтрофилов периферической крови здоровых женщин и женщин с различными стадиями РШМ (M±m)

Группы	Здоровые женщины (контроль) n=45	1 группа n=40	2 группа n=38	3 группа n=31
Ригидность, Па	360,8±14,1	314,8±23,00	433,0±7,67*	384,2±16,58

Примечание. * – данные статистически значимо отличаются от аналогичных у здоровых женщин.

Метод СЗМ позволяет измерять локальные упругие свойства поверхности клеток. Для Нф исследование механических свойств мембраны имеет первостепенное значение, поскольку процессы диапедеза и миграции в тканях и процесс фагоцитоза сопровождаются комплексными упруго-механическими реакциями. Помимо рецепторных взаимодействий, которые к настоящему времени достаточно полноценно ис-

следованы и охарактеризованы, в рекогносцировочных реакциях нейтрофилов важная роль принадлежит перестройкам цитоскелета, активации хемо- и механорецепторов [10, 11].

На рис. 1 представлены результаты сканирования препаратов интактных Нф здоровых женщин, на рис. 2 – больных РШМ стадии Ia (препараты фиксированы глутаровым альдегидом).



Рис. 1. Интактные нейтрофилы здоровых женщин:

а – изображение при сканировании в воздушной среде, б – сечение профиля нейтрофила, в – изображение в 3D

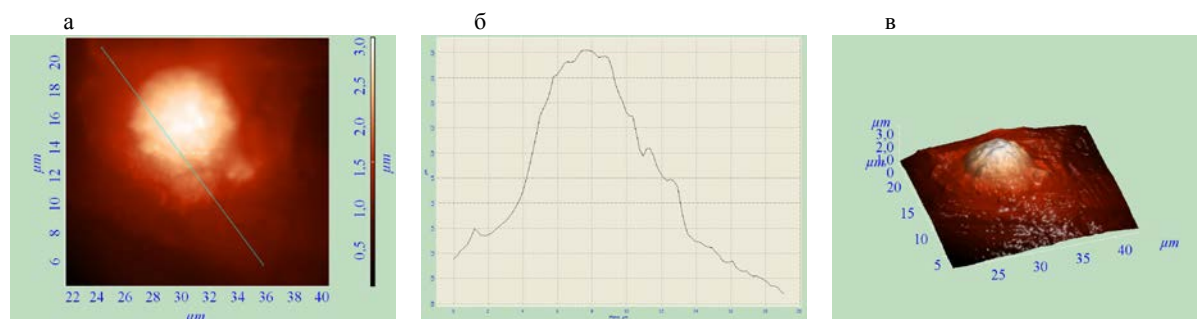


Рис. 2. Интактные нейтрофилы больных РШМ стадии Ia:

а – изображение при сканировании в воздушной среде, б – сечение профиля нейтрофила, в – изображение в 3D

На рис. 2а видны границы клетки, полиморфное сегментированное ядро и гранулы цитоплазмы, которые выявляются и по боковому сечению клетки. При этом Нф имеют строго округлую форму, и клетка распластана по поверхности подложки.

На рис. 3 представлены Нф больных РШМ Ib–IIa стадии. Клетки имеют четкую округлую форму, без микровыростов, ядерные структуры сконцентрированы ближе к центру, клетки не распластаны по подложке.

В пределах Нф наблюдается механическая неоднородность. Есть данные литературы, согласно которым клетка разделена, и ее актиновый цитоскелет формирует гетерогенную организацию [20].

В Нф больных РШМ на стадиях Ib–IIa и IIb–IV (рис. 4) степень гетерогенности снижается.

В Нф больных РШМ на стадии IIb–IV отсутствует выраженный край клетки, она увеличена в объеме по сравнению с Нф доноров (рис. 4).

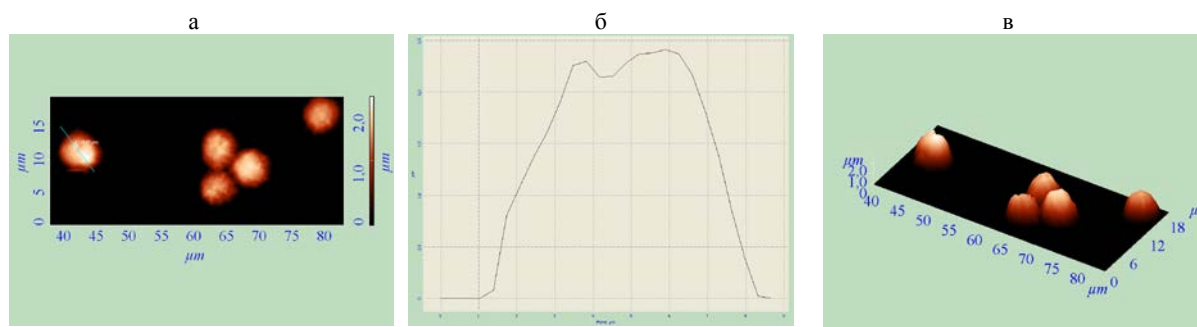


Рис. 3. Интактные нейтрофилы больных РШМ стадии Ib–IIa:

а – изображение при сканировании в воздушной среде, б – сечение профиля нейтрофила, в – изображение в 3D

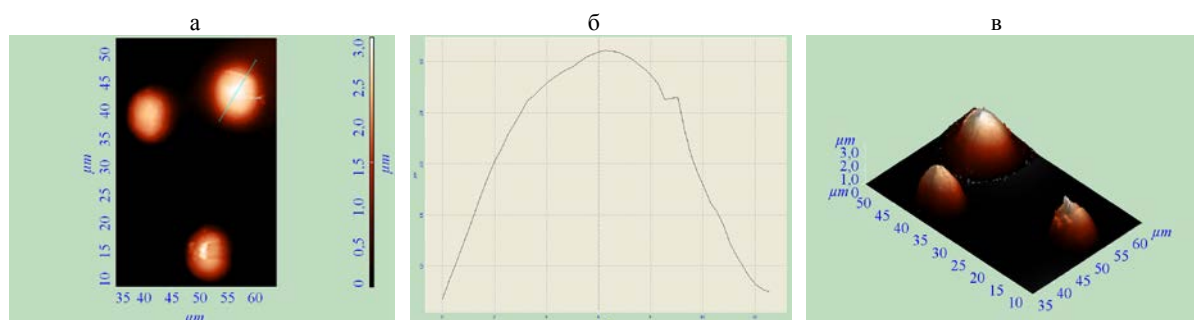


Рис. 4. Интактные нейтрофилы больных РШМ на стадии IIб–IV:

а – изображение при сканировании в воздушной среде, б – сечение профиля нейтрофила, в – изображение в 3D

Заключение. Таким образом, при РШМ на начальной стадии снижаются абсолютное количество Нф и их фагоцитарная активность при нарушении завершенности фагоцитоза и неизменной бактерицидной активности. При распространении процесса количество Нф и их бактерицидная активность возрастают, однако фагоцитарная активность снижается. При местнораспространенном РШМ жесткость мембраны Нф возрастает.

1. *Антонеева, И.И.* Нейтрофильные гранулоциты в динамике прогрессии рака яичников / И.И. Антонеева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – №8. – С. 43–46.

2. *Бахов, Н.И.* Роль нейтрофилов в регуляции метаболизма тканей (обзор литературы) / Н.И. Бахов, Л.З. Александрова, В.Н. Титов // Лабораторное дело. – 1998. – №6. – С. 3–12.

3. *Бережная, Н.М.* Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз / Н.М. Бережная. – К. : Наукова думка, 1988. – 187 с.

4. *Бородина, Т.М.* Функциональная активность сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов у детей с разными цитологическими вариантами острого миелолейкоза / Т.М. Бородина // Педиатрия. – 1996. – №8. – С. 44–49.

5. *Бохман, Я.В.* Руководство по онкогинекологии / Я.В. Бохман. – СПб. : Фолиант, 2002. – 542 с.

6. *Васильева, Г.И.* Цитокины – общая система гомеостатической регуляции клеточных функций / Г.И. Васильева, И.А. Иванова, С.Ю. Тюкавкина // Цитология. – 2001. – Т. 43, №12. – С. 1101–1111.

7. *Гусев, В.А.* Особенности окислительного метаболизма нейтрофилов крови у больных с острым миелобластным лейкозом / В.А. Гусев // Архив патологии. – 1990. – №3. – С. 12–13.

8. Исследование морфологии и ригидности мембран нейтрофильных гранулоцитов в режиме реального времени методом сканирующей зондовой микроскопии / С.Н. Плескова и др. // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, №6. – С. 712–715.

9. *Клебанов, Г.И.* Клеточные механизмы прайминга и агрегации фагоцитов / Г.И. Клебанов, Ю.А. Владимиров // Успехи современной биологии. – 1999. – Т. 119, №3. – С. 462–475.

10. *Лаврова, В.С.* Нейтрофилы и злокачественный рост / В.С. Лаврова, Н.В. Чердынцева, Н.В. Васильев. – Томск : Изд-во Томского ун-та, 1992. – 124 с.

11. *Сидоренко, Е.Г.* Обоснование и совершенствование прогностических тестов при раке шейки матки : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е.Г. Сидоренко. – Уфа, 2012. – 24 с.

12. Состояние нейтрофильных гранулоцитов у больных со злокачественными новообразованиями

- ями / Н.В. Чердынцева и др. // *Вопр. онкологии.* – 1989. – Т. 35, №4. – С. 429–433.
13. *Терещенко, И.П.* Роль системы нейтрофильных гранулоцитов в формировании особенностей развития патологического процесса / И.П. Терещенко, А.П. Кашулина // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 1993. – №4. – С. 56–60.
14. Функциональная характеристика нейтрофилов периферической крови больных раком яичников / В.Н. Блиндарь и др. // *Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМЕ.* – 2000. – №2. – С. 46–52.
15. *Хаитов, Р.М.* Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // *Иммунология.* – 1995. – №4. – С. 3–8.
16. *Clark, R.A.* Activation of the neutrophils kill microbes / R.A. Clark // *Ann. Rev. Immunol.* – 1999. – Vol. 23. – P. 197–223.
17. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration / Q.D. Wu et al. // *Am. J. Physiol. Cell.* – 2001. – Vol. 280, №4. – P. 814–822.
18. *Jgney, F.H.* CD 95L mediates tumor counterattack in vitro but induces neutrophil-independent tumor rejection in vivo / F.H. Jgney, C.K. Behrens, P.H. Krammer // *Int. J. Cancer.* – 2004. – Vol. 113. – P. 78–87.
19. *Korenkiewicz, A.* Nitroblue tetrazolium test in patients with neoplasma during surgical treatment / A. Korenkiewicz, K. Merkiel, J. Prokopowicz // *Neoplasma.* – 1983. – Vol. 30, №5. – P. 619–622.
20. *Lee, Y.J.* Local rheology of human neutrophils investigated using atomic force microscopy / Y.J. Lee, D. Patel, S. Park // *Int. J. Biol. Sci.* – 2011. – Jan. 20; 7(1):102–111.
21. *Mosczyński, P.* Enzymes of peripheral neutrophils in patients with stomach cancer / P. Mosczyński // *Pol. Tyg. Lek.* – 1983. – Vol. 38, №13. – P. 397–399.
22. *Mueller, M.M.* Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer / M.M. Mueller, N.E. Fusenig // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – Vol. 4, №11. – P. 839–849.
23. Neutrophils promote aerogenous spread of lung adenocarcinoma with bronchioalveolar carcinoma features / V. Witko-Sarsat et al. // *Clin. Cancer. Res.* – 2000. – Vol. 13. – P. 3518–3527.
24. Ovarian cancer cell modulate human blood neutrophils response to activation in vitro / M. Klink et al. // *Scand. J. Immunol.* – 2008. – Vol. 68. – P. 328–336.
25. Regression of an established tumor genetically modified to release granulocyte colony-stimulating factor requires granulocyte-T cell cooperation and T cell-produced interferon gamma / A. Stoppacciaro et al. // *J. Exp. Med.* – 1993. – Vol. 178, №1. – P. 151–161.
26. Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression / F. Shojaei et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105. – P. 2640–2645.
27. The potential role of innate immunity in the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma / G. Enblad et al. // *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* – 2007. – Vol. 21, №5. – P. 805–823.

NONSPECIFIC CELLULAR AT DIFFERENT STAGES OF UTERINE NECK CANCER

T.A. Abakumova, I.I. Antoneeva

Ulyanovsk State University

For an assessment of nonspecific cellular immunity used peripheral blood of 109 women at cervical cancer of Ia, Ib-IIa, IIb-IV of stages. At research in the neutrophilic leucocytes of phagocytic activity allocated from peripheral blood, level myeloperoxidase and cationic protein, and also at definition of a share of active neutrophils in spontaneous option of NST-test at patients in comparison with donors increase of absolute quantity of neutrophils at simultaneous decrease in them studied indicators at an initial stage of cervical cancer is revealed. At process distribution the quantity of neutrophils and their bactericidal activity increases, at the reduced phagocytic activity. At a locally advanced of cervical cancer rigidity of a membrane of neutrophils increases.

Keywords: cervical cancer, neutrophilic leucocyte.