Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

_____
институт

_____
кафедра

УТВ
ЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ _____
подпись инициалы, фамилия
« ____» _____20 __ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Особенности респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов
тема
при раке толстого кишечника

06.04.01 Биология

020400.68.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель_____профессор, д.м.н.Смирнова О. В.
подпись, дата

Выпускник _____ Нурутдинова Ф.Р.
подпись, дата

Рецензент_____ к.б.н., с.н.с. лаборатории
подпись, дата клинической патофизиологии
НИИ МПС Москаленко О.Л.

Красноярск 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....3
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....7
1.1 Клинико-эпидемиологические особенности рака толстого кишечника.....7
1.2 Основные этиологические факторы и группы риска.....10
1.2.1 Особенности питания и факторы внешней среды.....11
1.2.2 Наследственно-генетические факторы и предраковые заболевания.....13
1. 3 Патофизиология рака толстой кишки.....14
1.3.1 Клинические симптомы.....17
1.3.2 Диагностика и лечение.....17
1. 4 Роль нейтрофильных гранулоцитов в прогрессировании онкологических заболеваний.....18
1.4.1 Цитотоксический потенциал нейтрофила.....22
1.4.2 Проопухолевая активность нейтрофилов.....25
1.5 Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии.....27
1.5.1 Активные формы кислорода — генерация.....27
и повреждение тканей.....27
1.5.2 Роль активных форм кислорода в патологии клетки.....32
2 Материалы и методы.....37
2.1 Объект и материал исследования.....37
2. 2 Хемилюминесцентный анализ.....39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....55
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....56
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....57

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире колоректальный рак (КРР) является не только актуальной проблемой современной онкологии, но и одной из главных проблем общественного здравоохранения.

На сегодняшний день, по данным Nationalcancerinstitute, Российского общества клинической онкологии, принято считать, что понятие КРР включает в себя рак, развивающийся в ободочной и прямой кишке. Однако у онкологов всего мира нет единой точки зрения в вопросах этиологии и патогенеза КРР. Об этом говорит существование клинических рекомендаций по диагностике, лечению и наблюдению больных как КРР, так и раком ободочной и прямой кишки. Российское общество клинической онкологии, говоря про рак ободочной и прямой кишки в своих рекомендациях, также приравнивает каждый к КРР. В связи с этим под термином КРР можно считать злокачественную опухоль всей толстой кишки, включая прямую.

При изучении динамики заболеваемости раком толстой кишки выявлено, что на протяжении десятков лет отмечается существенный ее рост. При всех достижениях современной медицины КРР занимает лидирующие позиции в распространенности, являясь во всем мире третьим среди онкологических заболеваний по частоте у мужчин и вторым по частоте у женщин. В 2012 году в мире зарегистрировано примерно 1,4 миллионов новых случаев этого заболевания [3].

По данным Americancancersociety, наибольший рост заболеваемости раком толстой кишки наблюдается в Азии (Япония, Кувейт и Израиль) и Восточной Европе (Чехия, Словения и Словакия), что связывают с увеличением распространенности факторов риска его развития. В общей структуре онкологической заболеваемости в России рак толстой кишки составляет 11,5%. Среди мужского населения этот показатель достигает

11,4%, занимая третье место после злокачественных новообразований трахеи, бронхов, легких (17,8%), предстательной железы (14,4%).

В 2015 году в России зарегистрировано более 18 тысяч летальных случаев от КРР, причем с 2005 года наблюдается неуклонный рост данного показателя за счет смертей от рака ободочной кишки, в США в 2015 году зарегистрировано около 50 тысяч смертей от КРР, в Японии – более 50 тысяч смертей от этой патологии.

Так общая тенденция к росту заболеваемости КРР сохраняется, и данная патология по-прежнему занимает одну из лидирующих позиций по частоте встречаемости среди онкологических заболеваний. Уровень смертности также продолжает оставаться высоким, однако в некоторых регионах мира наблюдается тенденция к снижению данного показателя. Большинство больных при обращении к врачу уже находятся на поздней стадии заболевания. Поэтому наиболее актуальным остается вопрос ранней диагностики КРР, которая позволит улучшить показатели выживаемости и уровень жизни больных.

Известно, что нейтрофилы (полиморфоноядерныенейтрофильные гранулоциты), первыми мигрируют к опухоли на ранних стадиях ее формирования, усиленно инфильтрируют очаги опухолевого роста и становятся активными компонентами стромы. Важнейшим звеном патогенеза КРР, как и новообразований иной локализации, является процесс взаимодействия генетически измененной опухолевой ткани с иммунной системой организма человека. Нейтрофильные гранулоциты активно вовлекаются в реализацию противоопухолевого ответа — участвуют в уничтожении мутировавших клеток и первыми из клеток иммунной системы мигрируют к опухоли на ранних стадиях ее формирования [7].

Нейтрофильные гранулоциты способны осуществлять как непосредственную цитотоксичность, которая проявляется при активации секретной дегрануляции, респираторного взрыва, антителозависимой

клеточной цитотоксичности, так и опосредованную с помощью привлечения других клеток иммунной системы [7].

Одним из первых этапов взаимодействия организма с чужеродным объектом являются реакции неспецифического иммунитета, в частности респираторный взрыв. При этом потребление кислорода фагоцитом может увеличиться в течение нескольких секунд во много раз. В результате дыхательного взрыва образуются цитотоксичные метаболиты кислорода, свободные радикалы и перекисные продукты органических и неорганических соединений [2]. Образование АФК происходит в мембране фаголизосом за счет инициации фермента NADPH-оксидазы. [6].

В тоже время злокачественная опухоль неоднозначно влияет на функцию НГ, уменьшает их хемотаксическую активность, подавляя адаптивный иммунитет [10, 11, 12]. Несомненно, что от состояния противоопухолевого иммунитета будут зависеть, как распространенность, так и скорость прогрессирования онкологического заболевания [4]. Продукция активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами направлена на уничтожение чужеродных объектов, при этом, низкая продукция АФК может указывать на недостаточность защитного потенциала организма [5, 8]. Следовательно, способность нейтрофильных гранулоцитов продуцировать достаточное количество АФК может служить прогностическим признаком для оценки защитных сил организма [13]. Существуют различные способы оценки образования АФК, одним из наиболее чувствительных, является хемилюминесцентный метод.

В качестве активаторов хемилюминесценции (ХЛ) наиболее широко используются люминол и люцигенин. Известно, что существует химическая специфичность активаторов: люминол вступает в реакцию с АФК образуемыми различными ферментами, а люцигенин – только с супероксидным анион-радикалом. В качестве неспецифического индуктора дыхательного взрыва в хемилюминесцентной реакции применяют зимозан,

который представляет собой полисахарид, получаемый из культуры Saccharomycescerevisiae[14].

Таким образом, целью исследования стало изучение особенностей хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных с раком толстого кишечника для выявления факторов риска прогрессии заболевания.

В связи с целью были поставлены следующие задачи:

- Изучить показатели спонтанной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных с раком толстого кишечника в зависимости от стадии и в динамике относительно контрольной группы;
- Изучить показатели индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных с раком толстого кишечника в зависимости от стадии и в динамике относительно контрольной группы;
- Выявить факторы риска по показателям хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов в прогрессировании рака толстого кишечника.

Работа проводилась на базе лаборатории клинической патофизиологии (зав. лабораторией Смирнова О.В.) «НИИ медицинских проблем Севера» ФИЦ КНЦ СО РАН.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Клинико-эпидемиологические особенности рака толстого кишечника

Во всем мире колоректальный рак (КРР) является не только актуальной проблемой современной онкологии, но и одной из главных проблем общественного здравоохранения [1, 2]. На сегодняшний день, по данным Americancancersociety, Nationalcancerinstitute, Europeansocietyformedicaloncology, Российского общества клинической онкологии, принято считать, что понятие КРР включает в себя рак, развивающийся в ободочной и прямой кишке [3–7]. Однако у онкологов всего мира нет единой точки зрения по вопросам диагностики, лечения и наблюдения больных КРР. Об этом говорит существование клинических рекомендаций диагностики, лечения и наблюдения больных как КРР, так и раком ободочной и прямой кишки [6–10]

При изучении динамики заболеваемости раком толстой кишки выявлено, что на протяжении десятков лет отмечается существенный ее рост [11–15]. При всех достижениях современной медицины КРР занимает лидирующие позиции в распространенности, являясь во всем мире третьим среди онкологических заболеваний по частоте у мужчин и вторым по частоте у женщин [1, 16–18]. В 2012 году в мире зарегистрировано примерно 1,4 миллионов новых случаев этого заболевания: 746 300 у мужчин и 614 300 у женщин [16].

Имеются существенные различия в географическом распределении КРР [1, 2, 19, 20]. Принято считать, что уровень заболеваемости более характерен для индустриализованных стран с высоким уровнем доходов [2, 16, 19, 21–23]. Высокие ее показатели регистрируются в Северной Америке, Австралии, Новой Зеландии, Европе и Южной Корее, средние показатели – в Латинской Америке и низкие – в Африке и Южно-центральной Азии [2, 16, 19, 20]

В России отмечается достаточно высокий уровень заболеваемости и смертности от КРР. В общей структуре онкологической заболеваемости в России рак толстой кишки составляет 11,5%. Среди мужского населения этот показатель достигает 11,4%, занимая третье место после злокачественных новообразований трахеи, бронхов, легких (17,8%), предстательной железы (14,4%). Среди лиц женского пола КРР составляет 11,7% и занимает третье место после опухолей молочной железы (20,9%) и кожи (14,6%). В 2015 году в России зарегистрировано более 68 тысяч случаев рака толстой кишки [30]. В США КРР занимает 8%, одинаково среди мужчин и женщин. В 2015 году зарегистрировано около 140 тысяч новых случаев данного заболевания [31]. В Японии он занимает 14%. В 2015 году было выявлено около 136 тысяч его новых случаев [32]. Считается, что развитие КРР в 50% случаев связано с образом жизни и длительным воздействием канцерогенов [1, 33, 34]. Роли генетических факторов, как ведущих в развитии колоректального рака, отводится от 5 до 20% случаев [2, 35]. Основными причинами роста заболеваемости, связанными с факторами риска колоректального рака, являются: возраст старше 50 лет, курение, злоупотребление алкоголем, избыточное употребление красного мяса, низкое потребление цельных злаков, фруктов и овощей, гиподинамия, ожирение, генетические синдромы, аденоматозныйполипоз ободочной кишки, воспалительные заболевания кишечника, наличие семейного анамнеза, ранее перенесенный рак молочной железы или женских половых органов, диабет 2-го типа [1, 25, 30, 34, 36].

Ранние стадии рака толстой кишки обычно бессимптомны или малосимптомны [16]. В связи с этим, от 62,4 до 70% и более больных поступают в стационар на поздних стадиях заболевания [11, 40, 41]. По данным других авторов, количество таких больных варьирует от 14 до 36% [42, 43]. Первыми проявлениями заболевания чаще являются симптомы осложнений КРР [11–13].

Осложненный рак – это опухоли толстой кишки с обтурационной толстокишечной непроходимостью, перфорацией и кровотечением,

параканкрозными гнойно-воспалительными процессами, а также инвазией опухоли в соседние органы и ткани [12, 44, 46]. Осложненные формы КРР составляют от 40 до 70% и более от всего количества пациентов [11, 12, 44, 45].

В 2015 году в России зарегистрировано более 18 тысяч летальных случаев от КРР, причем с 2005 года наблюдается неуклонный рост данного показателя за счет смертей от рака ободочной кишки [22]. В США в 2015 году зарегистрировано около 50 тысяч смертей от КРР, в Японии – более 50 тысяч смертей от этой патологии [31, 32]. Продолжительность жизни больных КРР, главным образом, связана со степенью распространенности опухоли, наличием метастазов. При выявлении КРР на I стадии уровень пятилетней выживаемости составляет 93%, однако при прогрессировании заболевания наблюдается явное снижение выживаемости. При II стадии заболевания уровень пятилетней выживаемости снижается до 72%, при III стадии выживаемость не превышает 45%, при IV – показатель пятилетней выживаемости составляет 8% [11]. По данным американского онкологического сообщества, в США при выявлении КРР на I и II стадиях уровень пятилетней выживаемости составляет 90%, на III стадии – 70% и на IV – 13% [48]. Таким образом, общая тенденция к росту заболеваемости КРР сохраняется, и данная патология по-прежнему занимает одну из лидирующих позиций по частоте встречаемости среди онкологических заболеваний. Уровень смертности также продолжает оставаться высоким, однако в некоторых регионах мира наблюдается тенденция к снижению данного показателя. Большинство больных при обращении к врачу уже находятся на поздней стадии заболевания. Поэтому наиболее актуальным остается вопрос ранней диагностики КРР, которая позволит улучшить показатели выживаемости и уровень жизни больных.

1.2 Основные этиологические факторы и группы риска

Говоря о причинах возникновения колоректального рака необходимо отметить, что наиболее часто опухоль локализуется в тех отделах, где происходит задержка кишечного содержимого - в прямой кишке, сигмовидной и слепой. То есть, состав кишечного содержимого имеет значение для возникновения рака. Данные о частоте этого заболевания в различных странах и у разных групп населения свидетельствуют об этиологической роли факторов внешней среды, питания[11, 23, 27].

Большинство злокачественных новообразований прямой кишки развивается на фоне аденоматозных полипов или аденомы. Полипы гистологически классифицируются как тубулярные (малигнизация в 5 %), ворсинчатые (малигнизация в 40 %) или смешанные (малигнизация в 20 %). Степень дисплазии кишечного эпителия также играет важную роль в этиологии рака прямой кишки и колеблется от 5 % малигнизации (при низкой степени) до 35 % (при высокой степени). Риск малигнизации доброкачественных новообразований коррелирует и с размером аденом: 90 % имеют размеры менее 1 см (1 % риска),10 % – более 1 см (10 % риска). К важным факторам развития рака прямой кишки также относят: возраст пациентов (старше 50 лет); факторы питания (высококалорийная пища с избытком животных жиров и белков, недостаток растительной клетчатки, пищевые канцерогены); ожирение; малоподвижный образ жизни; курение.

1.2.1 Особенности питания и факторы внешней среды

Отмечен более высокий уровень заболеваемости среди тех групп населения, пища которых богата животными жирами, белками, легко усвояемыми углеводами и содержит мало клетчатки. Предполагается, что возникновение опухолей толстой кишки связано с изменением секреции желчи, состава желчных кислот и кишечной флоры под влиянием отдельных компонентов пищи, а именно жиры. Кроме того, содержание клетчатки в пище влияет на концентрацию, количество и метаболизм желчных кислот в

кишечнике. Выделение желчных кислот в просвет кишечника контролируется также уровнем эстрогенов в крови [34, 51].

Одно время широко дискутировался вопрос о холецистэктомии как этиологическом факторе при раке толстой кишки. Более детальное исследование, посвященное взаимосвязи между развитием рака толстой кишки и холецистэктомией, установило, что холецистэктомия приводит к значительному повышению уровня хенодезоксихолевой кислоты по сравнению с холевой. Относительное содержание вторичных желчных кислот после операции изменялосьнезначительно. Полученные данные свидетельствуют против гипотезы о том, что холецистэктомия индуцирует рак толстой кишки путем повышения количества выделяемых в кишечник вторичных желчных кислот. Высокая частота предшествующих холецистэктомий при раке толстой кишки объясняется высоким содержанием в желчи вторичных желчных кислот, что способствует камнеобразованию [3,9 11].

Наиболее постоянным фактором риска возникновения колоректального рака является содержание протеина в пище. Повышенный риск возникновения колоректального рака коррелирирует с общей калорийностью пищи. Ожирение и, в меньшей степени, чрезмерный вес являются признанными факторами риска возникновения рака толстой кишки. Канцерогенное влияние особенностей питания на толстую кишку и рост колоректального рака объясняется образованием нитросоединений в кишечнике [34].

Среди факторов, увеличивающих риск заболевания раком толстой кишки, называют алкогольные напитки. Риск возникновения колоректального рака зависит от количества потребляемого чистого алкоголя, независимо от типа алкогольных напитков. По мнению многих авторов, одной из причин заболеваемости раком толстой кишки могут быть химически вредные вещества, такие, как асбест, афлотоксин и другие вещества. В некоторых исследованиях по изучению злокачественных

опухолей отмечена связь между низким содержанием аскорбиновой кислоты в диете больших групп населения и возникновением различных форм рака. Было установлено, что у больных, страдающих раком толстой кишки, наблюдается выраженный дефицит витаминов А и С. Протективное влияние витамина С объясняется способностью аскорбиновой кислоты блокировать образование канцерогенных нитросоединений [36,40].

Многолетнее изучение особенностей питания показало, что риск заболевания снижается при употреблении пищи богатой содержанием клетчатки, пищевой рацион, в котором содержится большое количество овощей и фруктов, снижает риск развития рака толстой кишки. Имеются исследования, показывающий протективный эффект потребления растительного масла, употребление рыбы и других морских продуктов. Снижает риск развития рака толстой кишки приём ацетилсалициловой кислоты и других нестероидных противовоспалительных препаратов. Высокая физическая активность, как профессиональная, так и связанная с физическими упражнениями, тоже снижает риск развития рака толстой кишки [34].

1.2.2 Наследственно-генетические факторы и предраковые заболевания

Среди близких родственников больных раком толстой кишки эта форма рака встречается в 2—3 раза чаще, чем в других популяциях.

В результате генеалогического обследования семей пробандов с первичномножественными опухолями, показано, что частота рака толстой кишки среди родственников I степени родства составила 9 %, что превышает таковую не только в популяции (в 70 раз), но и среди родственников пробандов, болеющих раком толстой кишки (в 3,4 раза).

Риск развития рака толстой кишки очень высок у больных с некоторыми врождёнными болезнями, такими как семейный

аденоматозныйполипоз, синдромы Гарднера, Пейтца — Егерса, Тюрко, наследственного неполипозного рака толстой кишки [40].

Причиной возникновения семейного аденоматозногополипоза является герминальная мутация в гене APC. У 90% носителей мутированного гена APC к 45 годам развивается рак толстой кишки. Средний возраст появления первых признаков болезни – 20 лет. Наблюдаются тяжесть в животе, метеоризм, диарея, кровотечение [23].

Причинами возникновения наследственного неполипозного рака толстой кишки являются мутации в одном или нескольких генах, отвечающих за репарацию ДНК.

Синдром Гарднера – наследственная болезнь, характеризующаяся множественным полипозом прямой и ободочной кишки в сочетании с доброкачественными опухолями, чаще костей и кожи; наследуется по аутосомнодоминантному типу.

Синдром Пейтца-Егерса – наследственный полипоз желудочно-кишечного тракта, сочетающийся с коричневой мелкоточечной пигментацией слизистых оболочек губ и полости рта, а также кожи в окружности рта и тыльных поверхностей мелких суставов кистей. Колоректальный рак возникает у 40% больных [32].

Синдром Тюрко - наследственная болезнь. Проявляется сочетанием полипоза кишечника и опухоли (обычно глиомы) мозга.

Мутации гена BRCA I наследуются аутосомно-доминантно с неполной пенетрантностью и сопряжены с раком молочной железы, яичников, толстой кишки и предстательной железы.

Оценивая должным образом значение перечисленных выше факторов в развитии рака толстой кишки, большинство исследователей все-таки считают, что наиболее важное значение имеют полипы и полипоз кишечника. При этом частота малигнизации полипов колеблется от 10 до 50 %, а при диффузном (семейном) полипозе она достигает 100 %. Частота

малигнизации зависит от размеров полипов, их локализации, длительности заболевания, а также от их морфологической структуры [37, 12].

1.3 Патофизиология рака толстой кишки

Рак прямой кишки – опухоль, располагающаяся в пределах 15–18 см от края заднего прохода.

Ежегодно в Европе регистрируется до 100 тыс. вновь выявленных больных раком прямой кишки, в США – около 40 тыс. [6], в России за 2013 г. зарегистрировано 23 889 больных [3], при этом заболеваемость среди мужчин составляет 11,0, а среди женщин – 7,1 случая на 100 тыс. населения. Для классификации злокачественных новообразований используется система TNM, где компонент T отражает распространенность первичной опухоли, N – наличие, отсутствие и распространенность метастазов в регионарных лимфатических узлах, M – наличие или отсутствие отдаленных метастазов. Приводим описание данной нозологической формы согласно 7-му изданию Классификации TNM [4].

T – первичная опухоль

Tx Первичная опухоль не может быть оценена

T0 Отсутствие данных о первичной опухоли

TisCarcinomainsitu: внутрислизистая инвазия или в собственную пластинку слизистой оболочки

T1 Опухоль прорастает в подслизистую основу

T2 Опухоль прорастает в мышечную оболочку

T3 Опухоль прорастает в подсерозную основу или в не покрытые брюшиной периректальные ткани

T4 Опухоль прорастает в другие органы или структуры и/или в висцеральную брюшину.

T4a Опухоль прорастает в висцеральную брюшину

T4b Опухоль прорастает в другие органы или структуры

N – регионарные лимфатические узлы

Nx Регионарные лимфатические узлы не могут быть оценены

N0 Нет метастазов в регионарных лимфатических узлах

N1 Метастазы в 1–3 регионарных лимфатических узлах

N1a Метастазы в 1 регионарном лимфатическом узле

N1b Метастазы в 2–3 регионарных лимфатических узлах

N1c Опухолевый(ые) депозит(ы) в подсерозной основе, брыжеечных сосудах или неперитонизированныхпараколярной или параректальной тканях без метастазов в регионарных лимфатических узлах

N2 Метастазы в 4 и более регионарных лимфатических узлах

N2a Метастазы в 4–6 регионарных лимфатических узлах

N2b Метастазы в 7 и более регионарных лимфатических узлах

M – отдаленные метастазы

Mx Наличие отдаленных метастазов не может быть оценено.

M0 Нет отдаленных метастазов

M1 Есть отдаленные метастазы

M1a Метастазы в одном органе: печень, легкие, яичники, нерегионарный лимфатический узел (узлы)

M1b Метастазы более чем в одном органе или в брюшине.

Классификация TNM подразделяется на две:

а) клиническая классификация (cTNM или TNM) – применяется до начала лечения и основана на данных клинического, рентгенологического, эндоскопического методов исследования, биопсии, хирургических и ряда дополнительных методов исследования[23];

б) патологоанатомическая классификация (pTNM) – базируется на данных, полученных до начала лечения, но дополненных или измененных на основании результатов хирургического вмешательства или исследования операционного материала[23].

От доброкачественной аденомы до злокачественной карциномы проходит ряд стадий, включающий развитие ранней аденомы, поздней и далее злокачественной карциномы. Этот путь обеспечивают два главных механизма геномной нестабильности: хромосомная (chromosomalinstability, CIN) и микросателлитная (microsatelliteinstability, MSI). При хромосомной нестабильности происходит перестройка больших участков хромосом, что выявляется в 85 % случаев рака толстой кишки. Микросателлитная нестабильность (RER+-фенотип) – молекулярно-генетический феномен, открытый в 1993 г. M. Perucci и отражающий дефект репарации неспаренных оснований ДНК (mismatchrepair, MMR), наблюдается в 15 % случаев рака толстой кишки. Система MMR ответственна за распознавание и удаление неправильно спаренных оснований, образованных в результате ошибок в процессе репликации ДНК. При нарушении данного механизма, мутации в геноме клетки накапливаются со значительно большей скоростью, чем в нормальном состоянии. Данные нарушения отражают различные повреждения в генах-супрессорах опухолей: MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2. Именно они ответственны за работу механизма MMR[23, 34, 40].

1.3.1 Клинические симптомы

Наиболее характерный симптом – примесь крови в каловых массах. Отмечается в 70–75 % наблюдений. Как правило, выделяется небольшое количество крови. Наряду с кровью в кале появляются слизь и гной. Вторыми по частоте симптомами являются различные нарушения функции кишечника: ритм дефекации, изменение формы кала, возникновение и усиление запоров, поносов. Наиболее тягостными для больных являются частые позывы на стул, сопровождаемые выделением небольшого количества кала, крови, слизи, гноя, газов (ректальный «плевок»). После дефекации пациенты не испытывают чувства удовлетворения и у них остается ощущение инородного тела в прямой кишке. Такие симптомы,

каканемия, потеря массы тела, слабость, возникают при поздних стадиях процесса [45, 48, 54].

1.3.2 Диагностика и лечение

Пальцевое исследование прямой кишки. Ректальное исследование удобнее проводить в коленно-локтевом положении, а у женщин еще и лежа на спине в гинекологическом кресле. Оценивается тонус сфинктеров, определяется расстояние нижнего полюса опухоли от края заднего прохода. Опухоль представляет собой плотное образование, как правило, суживающее просвет кишки. Если это возможно, устанавливается протяженность опухоли, ее подвижность, отношение к окружающим органам и тканям. У женщин необходимо сочетать пальцевое исследование прямой кишки с исследованием влагалища [34,50].

Ректороманоскопия позволяет оценить новообразование, при этом забираются мазки-отпечатки для цитологического исследования, выполняется биопсия. Во время исследования можно определить консистенцию опухолей и степень их подвижности [46, 47].

Ультразвуковое исследование живота, позволяет с высокой степенью достоверности установить метастатическое поражение печени, глубину инфильтрации опухолью стенки кишки и окружающих тканей, выявить наличие абсцессов в зоне опухоли [45, 46].

Магнитно-резонансная томография является «золотым стандартом» в диагностике локального распространения рака прямой кишки, позволяя обоснованно установить показания к предоперационной лучевой терапии при распространении опухоли за пределы мышечного слоя с инвазией в параректальную клетчатку.

Компьютерная томография используется для установления местной распространенности опухолевого процесса, а также выявления метастазов в регионарных лимфатических узлах.

1.4 Роль нейтрофильных гранулоцитов в прогрессировании онкологических заболеваний

Нейтрофилы традиционно относятся к фагоцитирующим клеткам, которые благодаря ряду уникальных свойств (высокой подвижности, способности легко передвигаться в тканях, наличию мощных бактерицидных цитотоксических продуктов) рассматриваются как «высокопрофессиональные убийцы», составляющие своеобразный «отряд быстрого реагирования» в системе противоинфекционной защиты организма. Идея о фагоцитозе как способе защиты организма от болезнетворных агентов, впервые высказанная И.И. Мечниковым в 1883 году, стала наукообразующей и послужила фундаментом новой дисциплины – иммунологии. На протяжении почти столетия у нейтрофилов и макрофагов в основном исследовались функции, так или иначе обслуживающие фагоцитоз [5].

Однако фагоцитоз, хотя и важнейший, но не единственный способ реализации нейтрофилами своих эффекторных функций. Идея о том, нейтрофил – это секреторная клетка, впервые озвученная Паулем Эрлихом в 1890 году на XIII Международном медицинском конгрессе в Париже, не получила дальнейшего развития [21].

К середине 80-х годов прошлого столетия были проведены фундаментальные исследования по физиологии нейтрофилов. Установлено, что эти клетки в процессе созревания и активации образуют богатую гамму биологически активных продуктов, которые могут влиять на функции других клеток и регуляторных систем организма.

Что это за биологически активные продукты? Только в своих гранулах нейтрофил содержат более 50 соединений: ферментов, пептидов, рецепторов, а также в процессе активации образует токсические метаболиты кислорода, азота, метаболиты липидов, цитокины и антицитокины, вторичные продукты протеолиз а [3–4, 9–10].

В последние годы установлено участие нейтрофилов в противоопухолевом иммунитете в качестве клеток эффекторов антителозависимых цитотоксических реакций.

Десять лет назад немецкими учеными из Института инфекционной биологии имени Макса Планка [13] у нейтрофилов была обнаружена способность к образованию так называемых внеклеточных ловушек, основу которых составляют переплетающиеся нити ДНК, в которых располагаются гранулы с бактерицидными ферментами и пептидами. ДНК, гистоны, благодаря повышенной липкости, связывают чужеродные частицы, которые под действием антимикробных соединений гранул погибают. Ловушки позволяют создать высокую локальную концентрацию цитотоксических продуктов в основном в пространстве ДНК, в связи с чем минимизируется повреждение нормальных окружающих тканей такими молекулами. В этом и заключается, повидимому, биологический смысл образовавшихся сетей – защита здоровых тканей от токсических метаболитов нейтрофилов [4].

На сегодняшний день появились работы, касающиеся участия нейтрофильных внеклеточных ловушек в противоопухолевом иммунитете. Установлено, что в мазках-отпечатках карциномы молочной железы и других опухолей при специальной окраске обнаруживается большое количество сетеподобных внеклеточных структур, состоящих из нитей ДНК и миелопероксидазы [12, 14–15]. Возможно, что нейтрофилы при контакте с опухолевыми клетками образуют сети из нитей ДНК, которые ограничивают пролиферацию опухолевых клеток [5].

Нейтрофилы, или PMN, существуют, чтобы защитить хозяина от вторжения микроорганизмов и для оказания помощи в заживлении ран (2).

Инвазивные патогены вызывают воспалительный ответ, который рекрутирует нейтрофилы в места заражения. Оказавшись там, нейтрофилы поглощают и уничтожают микроорганизмы, используя арсенал цитотоксических веществ (3). Активированные нейтрофилы также выделяют протеиназы во внеклеточную среду, что приводит к повреждение окружающей ткани хозяина (4). Нейтрофилы, или PMN, существуют для защиты, но кроме того, нейтрофилы производят цитокины и хемокины, которые могут влиять на пополнение воспалительных клеток, изменение иммунного ответа(2). Этот процесс набора и активации PMN, наблюдается при инфекции. Тем не менее, накопленные данные свидетельствуют о том, что в микроокружении опухоли PMN действуют в ущерб принимающей стороне.

Основным механизмом иммунной защиты является фагоцитоз, независимо от типа фагоцитирующих клеток (полиморфно-ядерные лейкоциты, клетки макрофагально-фагоцитарной системы), процесс фагоцитоза обязательно сопровождается респираторным взрывом. Под респираторным взрывом (дыхательный взрыв,respiratoryburst) в фагоцитирующих клетках понимается процесс повышения синтеза активных форм кислорода (АФК), который развивается в клетках при фагоцитозе и регуляторных воздействиях. При этом, нужно отметить, потребление клетками кислорода резко возрастает. На данный момент, в понятие АФК включают широкий спектр реакционно-активных форм соединений кислорода (это радикалы, анионы), связанных с первичным синтезом супероксид-радикала. Все АФК делятся на две главные группы – первичные АФК и вторичные.

Синтез АФК связан не только с механизмами респираторного взрыва, но и с процессами окислительного стресса. Под окислительным стрессом (оксидативный стресс, oxidativestress) понимаются процессы повреждения клеток и биологических молекул в результате окисления, которое

развивается при повышении количества прооксидантов и уменьшении содержания антиоксидантов.

Методом оценки состояния респираторного взрыва фагоцитирующих клеток является хемилюминесцентный анализ. Под люминесценцией понимается широкий ряд реакций, в которых возбужденные молекулы переходят в основное состояние с испусканием кванта света. Люминесценция химических реакций называется хемилюминесценцией. Хемилюминесценция возникает в процессе реакции окисления или при рекомбинации радикалов. При этом, образующийся электронно-возбужденный продукт способен переходить в основное состояние, что сопровождается излучением видимого света. Свечение это довольно слабое, поскольку квантовый выход электронно-возбужденного продукта невысок (0,001 – 0,1). При этом под квантовым выходом хемилюминесценции понимается число испущенных квантов на один акт реакции.

Выраженные изменения синтеза АФК фагоцитирущими клетками обнаруживаются при инфекционно-воспалительных процессах. Также известно, что у больных широко распространенным гнойным перитонитом состояние респираторного взрыва нейтрофилов характеризуется повышением уровня синтеза как первичных, так и вторичных АФК [12]. Установлена информативность показателей респираторного взрыва нейтрофилов в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП) [23, 34].

В работе Л. М. Куртасовой с соавторами установлены особенности изменения состояния респираторного взрыва нейтрофилов у больных раком почки и мочевого пузыря в динамике заболевания [1]. Обнаруженные изменения зависят от локализации опухолевого процесса. У пациентов с раком почки изменения преимущественно затрагивают продукцию первичных АФК, у больных раком мочевого пузыря – начальные стадии окислительного метаболизма и вторичные АФК [45, 49].

Оценка респираторного взрыва фагоцитирующих клеток позволяет охарактеризовать фундаментальные механизмы реагирования клеток врожденного иммунитета на патогенные и регуляторные воздействия.

1.4.1 Цитотоксический потенциал нейтрофила

Нейтрофилы созревают в костном мозге и поступают в кровеносное русло предельно дифференцированными клетками, цитотоксический потенциал которых сформирован и представлен протеолитическими ферментами, бактерицидными пептидами и белками гранул, АФК и активными формами азота. При получения сигнала тревоги клетки мигрируют по градиенту концентраций хемотаксических факторов в область повреждения, где проявляют свою функциональную активность. В зонах максимальных концентраций хемотаксических факторов нейтрофилы используют весь свой цитотоксический потенциал для элиминации чужеродных антигенов и собственных трансформированных клеток. Нейтрофилы способны проявлять как непосредственную цитотоксическую активность за счет имеющегося собственного цитотоксического арсенала, так и опосредованную с привлечением других клеток иммунной системы. Непосредственная цитотоксическая активность нейтрофилов проявляется при активации секреторной дегрануляции рецепторного взрыва, АЗКЦ (антителозависимой клеточной цитотоксичности) [23, 36, 50].

Нейтрофилы имеют 4 типа гранул: азурофильные и специфические гранулы, С-частицы и секреторные везикулы. Азурофильные гранулы образуются первыми в процессе созревания нейтрофила на стадии промиелоцита. Они содержат кислые гидролазы (катепсины, В-глюкоронидазу), нейтральные протеазы (катепсины, лизоцим, миелопероксидазу) сериновые протеазы (протеазу-3, эластазу,ауроциин), дефенсины.Именно эти гранулы мобилизируются при фагоцитозе и участвуют в фаголизосом. Особую роль в защитных реакциях отводят

дефенсинам, которые обладают высокой токсичностью против определенных типов опухолевых клеток. На стадии метамиелоцита появляются специфические гранулы. Они содержат коллагеназу, лактоферрин, лизоцим, белок, связывающий витамин B12, и рецепторы для белков внеклеточного матрикса.

Другим «цитотоксическим оружием» нейтрофила являются АФК, которые непосредственно осуществляют разрушение чужеродных агентов и опухолевых клеток. АФК генерируются во время респираторного взрыва, инициируемого активацией сложного мембранного комплекса NADPH-оксидазы. Исходным продуктом генерируемым NADPH-оксидазой для образования широкого спектра АФК, включая производные азота и галагенов, в частности гипохлорную кислоту, образуемую при активации миелопероксидазы. Гипохлорной кислоте отводят особую роль, так как она вызывает быстрый лизис опухолевых клетоки образует хлорамины, обладающие иммуностимулирующими свойствами. Продуцируемые нейтрофилами АФК могут также активировать ингибиторы протеинкиназ, что, как и действие протеаз гранул нейтрофилов, приводит к элиминации клеток опухоли [45, 49].

Одним из механизмов проявления непосредственной цитотоксической активности нейтрофилов является антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). АЗКЦ проявляется при связывании Fc-рецепторов нейтрофилов с антителами, образовавшими иммунные комплексы с антигенами на поверхности клеток-мишеней, в качестве которых могут быть опухолевые или инфицированные клетки. Такое связывание приводит к активации нейтрофилов, в результате чего происходит гибель опухолевых клеток [23].

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) усиливает данный тип цитотоксичности нейтрофилов, стимулируя экспрессию высокоафинныхFc-рецепторов на их поверхности. Этот факт

послужил основой для разработки терапии онкологических заболеваний с применением ГМ-КСФ [34, 37].

В активном состоянии нейтрофилы помимо генерации АФК и выброса ферментов и белков гранул продуцируют растворимые хемотаксические факторы (цитокины и хемокины). Некоторые цитокины вызывают непосредственные повреждения инфицированных и опухолевых клеток. Показано, что паракринный выброс фактора некроза опухоли (ФНО-а), интерлейкинов (ИЛ-2, -4, -12), интерферонов (ИНФ-у) вызывает повреждение опухоли дегранулированных нейтрофилов. При этом нейтрофилы пребывают в тесном контакте с опухолевыми клетками [44, 48].

Помимо непосредственного цитотоксического действия цитокины обеспечивают опосредованную цитотоксическую активность нейтрофилов. Цитокины, продуцируемые нейтрофилами, привлекают клетки врожденного и адаптивного иммунитета, которые также способны элиминирвоать чужеродные антигены и трансформированные клетки. Показано, что выделенные нейтрофилами цитокины привлекают в зону развития опухоли и активируют макрофаги, естественные киллерные клетки (NK), дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты. Кроме того, цитокины и хемокины ингибируют ангиогенез, что приводит к ишемии и некрозу опухоли. Продуцируя цитокины, нейтрофилы сдвигают баланс между гуморальными и клеточно-опосредованными иммунными реакциями через активацию клеток Т-хелперов 1-го или 2-го типов. Таким образом, функционирование нейтрофилов обеспечивает взаимодействие врожденного и адаптивного иммунитета [49].

Различные цитокины, такие как ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-а, ИНФ-у, продуцируемые клетками иммунной системы, активируют нейтрофилы и замедляют процесс их вхождения в апоптоз. В результате увеличения продолжительности жизни нейтрофилы успевают мигрировать в лимфатические узлы, где представляют антигены трансформированных клеток лимфоцитам, запуская каскад специфических реакций иммунитета,

подобно макрофагам и дендритным клеткам. Таким образом, презентацию антигенов цитотоксическому воздействию нейтрофилов [41,43, 44].

1.4.2Проопухолевая активность нейтрофилов

Наряду со значительным количеством работ, в которых показана противоопухолевая активность нейтрофилов, в последнее время появились работы, свидетельствующие о проопухолевой активности нейтрофилов. Удивительно, что цитотоксический потенциал нейтрофила может быть направлен на уничтожение опухолевых клеток и в то же время способствовать прогрессии опухоли, усиливая процессы мутагенеза, ангиогенеза и метастазирования.

Протеолитические ферменты, выбрасываемые нейтрофилами, могут способствовать ангиогенезу, инвазии, метастазированию опухоли. Среди протеолитических ферментов, секретируемых инфильтрирующими опухоль нейтрофилами, особое значение имеют матриксные металлопротеиназы (ММП)-9 и -13, которые активно преобразуют межклеточный матрикс. ММП-9 является ключевым медиатором ангиогенеза, так как стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов. В экспериментах с мышами, дефицитными по ММП-9, наблюдали снижение скорости пролиферации эпителиальных клеток, замедление ангиогенеза и прекращение развития опухоли. Кроме того, нейтрофилы способствуют распространению опухоли по организму. Они помогают отделиться одиночным опухолевым клеткам от первичной опухоли, что показано invitro на культуре клетокA549 и invivo при работе с пациентами с аденокарциномой легкого. Нейтрофилы облегчают распространение опухолевых клеток по межклеточному матриксу за счет его протеолитической деградации. Кроме того, нейтрофилы способствуют преодолению эндотелиального барьера опухолевыми клетками и их прохождению через стенки сосудов [36].

АФК, продуцируемые нейтрофилами, обладают канцерогенным потенциалом, увеличивая количество мутаций в клетках. Разные формы АФК

повреждают хроматин, ДНК, мембраны, изменяют концентрацию внутриклеточного кальция. В результате повреждения ДНК (окисления оснований, их модификации, в том числе точечные мутации, делеции или перестройки. Мутации накапливаются и приводят к злокачественному перерождению клеток. Кроме прямого мутагенного действия АФК могут косвенно способствовать развитию опухоли [24].

Цитокины, продуцируемые нейтрофилами, как описано выше, вызывают повреждения опухолевых клеток. Ноимеются факты, свидетельствующие о том,что действие цитокинов способствует и прогрессии опухоли. Так, пролонгированная секреция ИЛ-15 усиливает развитие лимфом у мышей, ИЛ-6 участвует в возникновении и развитии лимфом, вызванных канцерогенами. ФНО-а рассматривают как ключевой цитокин, продуцируемый во время воспаления, который создает благоприятные условия для развития опухоли. Помимо этого, цитокины, продуцируемые нейтрофилами, привлекают другие воспалительные клетки, которые также способствуют ангио- и онкогенезу [45].

Описанное действие нейтрофилов проявляется чаще всего на более поздних сроках роста опухоли, что соответствует III—IV стадии онкологического заболевания. Вероятно, в этот период иммунная система уже не справляется с развивающейся опухолью, а защитные механизмы иммунитета приобретают патологическую направленность, усугубляя онкологическое заболевание и способствуя его развитию[26].

Изложенные данные свидетельствуют о том, что роль нейтрофилов в генезе опухоли неоднозначна: их активность приводит к деструкции опухолевых клеток и, наоборот, способствует прогрессии опухоли и метастазированию. Интригующий вопрос о том, почему нейтрофилы не продолжают борьбу против рака, а переходят на сторону опухоли на поздних стадиях ее развития, в настоящее время остается без ответа.

1.5 Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии

Активные формы кислорода (АФК), как стало понятно в последнее время, составляют отдельную систему в организме, участвующую как в ряде физиологических функций, так и во многих патологических процессах. Главным системообразующим фактором здесь, видимо, является текущий уровень АФК в тканях. Система АФК самоорганизована за счет положительных и отрицательных связей: имеется множество механизмов контроля — уровня генерации АФК в митохондриях и микросомах, контроля активности оксидаз и антиоксидантных ферментов тканей, суммарного уровня антиоксидантной активности (АО) крови. В ходе естественного старения организма (эволюции всего организма как более высокой надсистемы) изменяются различные элементы системы АФК; изменяется состояние системы АФК и в ходе различных патологических процессов. Знание системы самоорганизации АФК и основных закономерностей ее функционирования важно как для понимания закономерностей физиологического функционирования тканей организма в норме, так и особенностей течения многих патологических процессов и выбора способов активного влияния на них [23, 45, 47, 50].

1.5.1 Активные формы кислорода — генерация и повреждение тканей

Известно, что энергия образуется в клетках в процессах окисления определенных субстратов, прежде всего, в ходе окислительного фосфорилирования. Главными ферментами метаболизма кислорода у млекопитающих являются оксидазы и оксигеназы. Кроме 4-х электронного восстановления O_2 до H_2O в дыхательной цепи митохондрий, происходит и 1-, 2-, 3-электроное восстановление с образованием АФК по реакции:

$$O_2(+e^-) \rightarrow {}^{\bullet}O_2^- \ (+e^-, 2H^+) \rightarrow H_2O_2\,(+e^-) \rightarrow HO^{\bullet} \rightarrow (+e^-, 2H^+) \rightarrow 2\,H_2O$$

Донорами электронов являются металлы с переменной валентностью (главным образом Fe^{2+}, а также Cu^{2+} и другие), входящие в состав ряда ферментов. АФК — это, с физико-химической точки зрения, прежде всего свободные радикалы, которые имеют на внешней электронной оболочке неспаренный электрон. АФК генерируются во всех частях клетки. 95–98 % вдыхаемого O_2 расходуется на выработку энергии и окислительный метаболизм субстратов, 2–5 % O_2 переходит в активные формы кислорода. В тканях организма кислород (O_2) обычно не вступает в неферментативные реакции, а в виде АФК. Важнейшими АФК считаются: супероксидный радикал $*O_2^-$, синглетный кислород $^1O_2$, гидроксильный *OH и пероксидныйHO*$_2$ радикалы, перекись водорода H_2O_2, пероксидный ион HO_2^-, гипохлорит HOCl. Средняя концентрация их в тканях человека составляет 10–8 мМ. При снижении эффективности антиоксидантных систем организма АФК могут оказывать повреждающее воздействие на клетки и вызывать различные заболевания [43].Основные механизмы генерации АФК связаны с нарушениями функционирования электронно-транспортных цепей митохондрий или микросом, особенно при низкой концентрации АДФ, а также при изменении свойств дегидрогеназ. Важна роль и системы цитохрома Р-450, локализованной в эндоплазматической сети. Главным источником АФК в организме человека и животных служат клетки-фагоциты: гранулоциты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы [45]. Мембраны фагоцитов содержат ферментативный комплекс (НАДФН-оксидазу), который окисляет НАДФН до НАДФ$^+$ за счет восстановления O_2 до супероксидного радикала:

$$НАДФН + 2O_2 > НАДФ^+ + 2\,{}^*O_2^-$$

В фагоцитах комплекс НАДФН-оксидаза обеспечивает «окислительный взрыв» — быстрое избыточное образование $*O_2^-$в ходе стимуляции неспецифической защиты организма для разрушения бактерий. Фагоцит выделяет в окружающую среду АФК и ряд ферментов, среди которых миелопероксидаза катализирует реакцию образования гипохлорита

из аниона хлора и перекиси водорода. Кроме того, в присутствии ионов железа происходит образованиеОН* радикала из перекиси водорода и гипохлорита. Активированные фагоцитыдля борьбы с чужеродными клетками образуют ряд АФК, которые при взаимодействии друг с другом и с другими молекулами образуют также синглетный кислород $^1O2$.

АФК генерируются в ходе различных процессов в организме. $^1O_2$ образуется и в реакциях фотоокисления в присутствии фотосенсибилизаторов: флавины, гематопорфирин и др., а также при дисмутациисупероксидных радикалов. O_2 агрессивен в отношении биосубстратов, в особенности молекул с двойной связью; конечным итогом таких реакций обычно является образование гидроперекисей органических молекул в процессах перекисного окисления ненасыщенных липидов в биомембранах. В присутствии металлов с переменной валентностью эти продукты запускают цепные реакции окислительной деградации биомолекул с образованием липидных радикалов, пероксилов и гидропероксидов. Перекисное окисление липидов осуществляется неферментативным путем, а также с участием липоксигеназ и циклооксигеназ. АФК вызывает также окисление нуклеотидов и нуклеиновых кислот, особенно ДНК и белков. Главным защитным механизмом такого процесса является β -каротин, переводящий синглетный кислород в триплетный, однако, обычная вода и α-токоферол также способны инактивировать $^1O_2$. В клинической практике $^1O_2$ участвует в кожных проявлениях некоторых генетических заболеваний — порфирий, а также в процессах эритемы при ультрафиолетовом облучении кожи при приеме лекарств, обладающих фотосенсибилизирующим действием [34, 35, 48].

В процессе присоединения электрона к молекуле O_2 образуются супероксидный анион-радикал $*O_2^-$и гидроперекисный радикал HO_2* ; оба они порождают ряд других АФК [50].

Основное количество $*O_2^-$образуется в митохондриях, которые используют 85–99 % потребляемого O_2. Генерация $*O_2^-$происходит в

дыхательной цепи и микросомах при случайных сбоях в цепи переноса электронов, особенно при недостатке O_2. Эти радикалы играют также важную роль в защитных неспецифических иммунных механизмах организма при инфекционных и других воспалительных процессах. Основными источниками $*O_2^-$являются ферментные системы: НАДФН-оксидаза фагоцитирующих клеток, ксантиноксидаза, митохондриальнаяцитохром с-оксидаза и микросомальныемонооксигеназы. Гидроперексиный радикал $^{-}HO_2*$ реагирует с линолевой, линоленовой,арахидоновой кислотами, окисляя их до гидроперекисей. Образованию HO_2* радикала способствует закисление среды, он также свободно проникает через биомембраны, так как не несет зарядаГидроперекиси липидов являются активными соединениями и обладают высокой биологической агрессивностью. Для протекания цепного окисления липидов в биологических мембранах необходимы переходные металлы, в частности, ионы железа [31, 35, 37].

Дисмутация – O_2 анион-радикалов под действием супероксиддисмутазы (СОД) в биологических тканях ведет к образованию перекиси водорода H_2O_2, способной легко проникать через мембраны клеток. H_2O_2 обнаруживается при фагоцитозе, при работе митохондрий и микросом. В присутствии ионов переходных металлов (например Fe^{2+}) перекись водорода может давать высоко активный гидроксильный радикал (*OH), обладающий наибольшей цитотоксичностью среди АФК. Это определяет его преимущественно местное действие. При этом главными видами повреждений биомолекул являются: отрыв атома водорода (таким образом повреждается лецитин — компонент биологических мембран, а также сахара в составе нуклеозидов ДНК); присоединение к молекулам по двойным связям (взаимодействие с пуринами и пиримидинами ДНК и РНК, перенос электронов также является важным в повреждающем действии *OH. Прямое повреждение ДНК при этом характеризуется разрывом цепи, окислением оснований, их модификации, образованием гидропероксидов ДНК,

повреждением хромосом. С белками *OH образует гидропероксиды, что может изменить третичную структуру белков и даже вызывать их агрегацию и денатурацию. Это приводит к нарушению ферментативной и регуляторной активности многих процессов. С липидами *OH образует перекисные соединения. В образовании радикала *OH важное значение имеют ионы металлов с переменной валентностью, в первую очередь Fe^{2+}, входящие в состав гемоглобина, миоглобина и др.); в крови они находятся в связанной форме — с трансферрином. Отмечена генерация *OH радикала и под действием связанного железа — лактоферрина, а также при действии гемоглобина на перекись водорода. Реакция цепного окисления липидов играет важную роль в клеточной патологии. Она начинается с внедрения в липидный слой мембран радикала *OH [45].

Будучи незаряженным, он способен проникать в толщу гидрофобного липидного слоя и вступать в химическое взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами биологических мембран и липопротеинов плазмы крови. При этом образуются липидные радикалы, которые вступают в реакцию с растворенным в среде O_2, образуя радикал липоперекиси. Этот радикал атакует одну из соседних молекул фосфолипида с образованием гидроперекиси липида и нового радикала. Далее развивается цепная реакция. При чрезмерном накоплении АФК и вторичных продуктов возникают патологические состояния, называемые оксидативным стрессом.

Рисунок 1 - Общая схема формирования активных форм кислорода и антиоксидантной защиты организма

1.5.2 Роль активных форм кислорода в патологии клетки

Митохондрии более всех других органелл подвержены атаке АФК и, как следствие, повреждению мембранных липидов, белков, ДНК и даже гибели. Причем для гибели митохондриям не требуется никаких дополнительных белков, кроме тех, которые присутствуют в них самих. Митохондрии обладают системой защиты от АФК, которая включает ферменты супероксиддисмутазу (нейтрализация супероксид-аниона в перекись водорода), пероксидазу и глутатионпероксидазу (деградация перекиси водорода), а также глутатион, восстановленную форму коэнзима Q, аскорбиновую кислоту и другие низкомолекулярные антиоксиданты. Когда митохондрии перестают справляться с проблемой детоксикации образуемых ими АФК, несмотря на перечисленные механизмы защиты, то в клетке развивается так называемый «окислительный стресс». В результате избыточного образования кислородных радикалов, последние начинают выполнять в основном деструктивные функции, нежели служат в качестве

сигнальных молекул. Происходят специфические изменения клеточных компонентов: повреждаются мембранные структуры из-за перекисного окисления липидов (ПОЛ), происходит окисление белков по остаткам тирозина, цистеина и серина, повреждение ДНК, смещение редокспотенциала клетки из-за окисления глутатиона и НАД(Ф)Н. Наблюдается разрушение митохондриальных структур от мембраны до митохондриальных ДНК (мтДНК) [30, 41]. Окислительный стресс является причиной множества дегенеративных заболеваний, старения и гибели клетки. Активные формы кислорода, образующиеся в митохондриях, рассматриваются в качестве основного фактора развития внутриклеточного окислительного стресса под воздействием гипоксии, ишемии и реперфузии [10, 27]. Образование АФК с участием митохондрий играет важную роль в индукции апоптоза при патофизиологических процессах в нейронах, кардиомиоцитах, а также в процессе старения. Считается, что предрасположенность нервной ткани к окислительному стрессу связана с высоким уровнем окислительного метаболизма и повышенной генерацией кислородных радикалов, большим содержанием липидов и прооксидантов, относительно низкой активностью антиоксидантных систем и наличием нейронов с высоким содержанием NO-синтазы [25]. Повышение продукции АФК в митохондриях при недостатке антиоксидантов, например, при ишемии головного мозга, приводит к повреждению электронтранспортной цепи митохондрий, к снижению синтеза АТФ и связанному с этим понижению активности АТФ-зависимых ферментов. АФК оказывают повреждающее действие, прежде всего, на мембраны митохондрий. В частности, под действием АФК в белке внутренней мембраны митохондрий, который обеспечивает сопряженный перенос АТФ/АДФ, происходит окисление SHгруппы Cys-56, что способствует образованию неспецифического митохондриального канала (mPTP), проницаемого для низкомолекулярных веществ [21, 37]. АФК значительно влияют на концентрацию ионов кальция в матриксе митохондрий и цитоплазме клеток,

провоцируя закачку Ca2+ в цитоплазму из внеклеточного пространства и внутриклеточных депо, а в матрикс — из цитоплазмы, путем активации кальциевых транспортеров [34].

Митохондриальная ДНК (мтДНК) является еще одной уязвимой мишенью для патогенного действия АФК. Высокая концентрация активных форм кислорода в митохондриях и слабая система репарации этих органелл увеличивают частоту мутаций мтДНК по сравнению с ядерной ДНК. Радикалы кислорода служат причиной специфических замен в молекуле ДНК. Так, гидроксил-радикал оказывает повреждающее действие на ДНК вследствие окисления оснований, их модификации, повреждения хромосом. Подобные мутации могут привести к патологии и гибели клетки или её злокачественному перерождению. Повреждение мтДНК особенно опасно в связи с постепенным накоплением мутаций, длительным эффектом АФК. В митохондриальном геноме закодирован ряд важнейших уникальных митохондриальных белков, и повреждение ответственных за них генов приводит к нарушениям в их экспрессии и последующем функционировании. Установлена четкая корреляция между возрастом и накоплением мутаций в мтДНК, падением эффективности дыхания и увеличением продукции АФК, что легло в основу митохондриальной теории старения [45]. Свободные радикалы кислорода и продукты ПОЛ, образование которых они индуцируют, играют одну из ведущих ролей в патогенезе отека-набухания головного мозга и метаболических нарушений в мозговой ткани в посттравматический и постишемический периоды [20, 30]. В условиях развития окислительного стресса не очень токсичная молекула пероксида водорода в присутствии двухвалентного железа может генерировать гидроксильный радикал или превращаться в гипохлорит-анион (OCl–) ферментом миелопероксидазой. Как гипохлорит-анион, так и гидроксилрадикал являются сильными окислителями. Они способны модифицировать белки, нуклеиновые кислоты, индуцировать ПОЛ, которому наиболее сильно подвергаются полиненасыщенные жирные кислоты,

входящие в состав липидов мембран. При перекисном окислении липидов кислородный радикал, чаще всего это бывает гидроксил-радикал, который хорошо проникает в мембраны, будучи незаряженным, отнимает атом водорода от молекулы жирной кислоты с образованием перекисного радикала жирной кислоты. Этот радикал запускает цепную реакцию, взаимодействуя с другой жирной кислотой, в ходе которой образуются перекись кислоты и новый радикал:

$LH + HO\bullet \rightarrow L\bullet + H_2O$;

$L\bullet + O_2 \rightarrow LOO\bullet$;

$LOO\bullet + LH \rightarrow LOOH + L\bullet$,

и так далее. Такая цепная реакция затрагивает значительное количество клеточных липидов, в результате чего повреждаются мембраны. Кроме того, может происходить и амплификация окислительного повреждения за счет распада гидроперекисей на два новых радикала, каждый из которых запускает свою цепь [43].

В рамках общей концепции окислительного стресса большое значение имеет феномен АФКиндуцированного образования АФК [49]. Согласно этому феномену небольшие количества индуцирующих АФК приводят к падению трансмембранного потенциала и активной генерации вторичных АФК, что ведет к развитию «окислительного взрыва». Предположительно в ходе АФК-индуцированного образования АФК происходит окисление белков и регуляторных тиолов, которые изменяют редоксстатус клетки, инициируя неспецифическую проницаемость мембран. Изменение неспецифической проницаемости носит обратимый характер, но все же приводит к нарушению функционирования электрон-транспортной цепи, изменению свойств мембран и, в конечном счете, к «окислительному взрыву». При повреждении МФК I дыхательной цепи происходит прямое окисление белков, разрушение железосерных кластеров, нитрозилирование и глутатионилирование, вследствие чего значительно снижается его активность. Такие изменения наблюдаются, например, при ишемической болезни сердца и ишемии-

реперфузии. АФК разрушают белки, разделяя их на меньшие пептиды. Это происходит следующим образом. Гидроксильный радикал отнимает протон от -CH(R)- группы белка, образуя воду. Образовавшийся алкил-радикал может связаться со вторым алкил-радикалом, либо прореагировать с кислородом, образовав алкил-пероксид радикал. Далее алкил-пероксид радикал, присоединяя протон, образует алкил-пероксид. Протон он получает, реагируя либо с Fe2+, либо с пероксильным радикалом (HO2 ●). Алкил-пероксид белка может реагировать с таким же пероксидом (дисмутация), высвобождая кислород и образуя алкокси-белок. Алкокси-белок может также образовываться путем восстановления алкил-пероксида либо Fe2+, либо пероксильным радикалом. В итоге исходный белок разделяется на более мелкие пептиды, что приводит к его дисфункции. Примером действия АФК в условиях их избыточного образования может служить реперфузия миокарда или сосудов мозга после периода ишемии (инфаркт миокарда или инсульт головного мозга), сопровождающаяся развитием повреждений, сопоставимых или даже превышающих по степени возникшие в результате самой ишемии. Механизм образования АФК при реперфузии, вероятно, обусловлен созданием условий, благоприятствующих образованию вторичных радикалов. Во время ишемии парциальное напряжение кислорода в кардиомиоцитах резко снижается, и это сопровождается переходом окисленных атомов железа Fe3+ в восстановленные Fe2+, а также повышением активности ксантиноксидазы. Оба эти компонента при появлении в цитоплазме больших количеств кислорода в начале реперфузии резко активируют образование ●OH, и возникающее под действием этогорадикала повреждение клеточных структур может приобретать необратимый характер с развитием апоптоза. Самым распространенным патологическим состоянием, приводящим к значительной вспышке продукции АФК, является гипоксия и последующая реоксигенация. При продолжительной гипоксии существенно изменяется активность ряда клеточных ферментов, происходит истощение и повреждение

антиоксидантных защитных систем, и быстрое восстановление компонентов дыхательной цепи за счет обращения АТФ-синтазной реакции, используемой для создания протонного градиента в условиях недостатка кислорода. В результате всех этих изменений при последующей реоксигенации утечка электронов с комплексов дыхательной цепи и генерация супероксидрадикала значительно увеличивается [39]. В условиях нормоксии повышенная генерация активных форм кислорода, приводящая к окислительному стрессу, наблюдается обычно только в очагах воспаления [11]. В данном случае процесс генерации АФК обусловлен функциональной активностью НАДФН-оксидазных систем макрофагов и является жестко регулируемым, оказывая деструктивное влияние только на те клетки, на которые направлена иммунная реакция.

2 Материалы и методы

2.1 Объект и материал исследования

В исследование включены 36 больных раком прямой кишки, в возрасте от 26 до 78 лет. Средний возраст обследованных больных составил 61± 11,5 лет. Среди пациентов с РТК мужчин было 43%, а женщин 57%.

На I и II стадии заболевания находились 50% исследуемых больных (5 человек на I стадии и 13 человек на II стадии), на III стадии 25% (9 пациентов) и на IV стадии 25% (9 пациентов). Всемпациентамвыполненаморфологическаяверификация опухоли: высокодифференцированная аденокарциномавыявленау6больных, умереннодифференцированная—у 24, низкодифференцированная—у4, перстневидноклеточный рак у 1 больного, плоскоклеточный рак у 1 больного. Всем больнымвыполненохирургическоевмешательствовразличныхобъемах.Контрольная группа состояла из 112 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с группой обследованных больных. Группа контроля была отобрана при профилактических осмотрах.

Исследование проводилось с разрешения этического комитета ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» (директор – д.м.н., профессор Каспаров Э.В.). Каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование, согласно Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, регламентирующей проведение научных исследований.

Материалом исследования являлась венозная кровь, которая забиралась при поступлении больного в отделение ОНКОДИСПАНСЕРА до начала патогенетической терапии утром натощак из локтевой вены в вакутейнеры с гепарином и в динамике на 7 день после хирургического лечения.

Лабораторные исследования проводились в лаборатории клинической патофизиологии ФГБНУ ФИЦ КНЦ СО РАН «НИИ медицинских проблем Севера». В качестве метода изучения противоопухолевой активности

нейтрофильных гранулоцитов использовался хемилюминесцентный анализ спонтанной и индуцированной продукции АФК НГ больных РТК. Оценку спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе “CL 3607” (Россия).

Регистрация результатов и управление анализатором осуществлялись через персональный компьютер. Определялись следующие характеристики: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции (Tmax), максимальное значение интенсивности хемилюминесценции (Imax), площадь под кривой хемилюминесценции (S). В качестве усилителя хемилюминесценции использовали люминол. Индуктором респираторного взрыва служил опсонизированныйзимозан. Усиление хемилюминесценции, индуцированной опсонизированнымзимозаном, оценивали по соотношению площади индуцированной (Sинд) к площади спонтанной (Sспонт) хемилюминесценции и обозначали индексом активации [9].

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoftInc., США, 2008).

2.2 Хемилюминесцентный анализ

В качестве метода изучения противоопухолевой активности нейтрофильных гранулоцитов использовался хемилюминесцентный анализ спонтанной и индуцированной продукции АФК НГ больных РТК.

Лейкоцитарный супернатант дважды отмывают в растворе Хенкса без фенолового красного по 10 мин при 500g.Супернатант сливают, оставшиеся нейтрофильные гранулоциты разводят в 1 мл Хенкса и получают взвесь. Для подсчета клеток в планшет добавляют 40 мкл уксусной кислоты и 10 мкллейковзвеси и подсчитывают количество нейтрофильных гранулоцитов в камере Горяева в 5 больших квадратах по диагонали. Количество клеток определяют по формуле (X|* 11 * 1000)/0,02=(X2/2000000)

1 - количество раствора Хенкса необходимое добавить к 1 мл лейкоцитарной суспензии, где X - суммарное количество клеток в 5 квадратах, X2-количество нейтрофилов в 1 мл суспензии (необходимое количество клеток 2*106).

Для проведения хемилюминесцентного анализа используют следующие реактивы: донорскую сыворотку (группа крови АВ, резус-фактор отрицательный), раствор Хенкса (без фенолового красного), люминол или люцигенин в концентрации 100 мкг/мл. Готовят пробу: 200 мкл взвеси нейтрофильных гранулоцитов, 20 мкл донорской сыворотки, 240 мкл раствора Хенкса, 50 мкллюминола или люцигенина и 40 мклзимозана. Спонтанная хемилюминесценция осуществляется без добавления индуктора, а индуцированная хемилюминисценция с добавлением зимозана при помощи хемилюминесцентного анализатора, например «С L3604» в течение 90 мин. Регистрация результатов и управление хемилюминесцентным анализатором осуществляют через компьютер. Получают кривую хемилюминесценции. Определяют величину Tmax, Imax, Smax для каждого показателя (спонтанная) хемилюминесценция, зимозан–зависимая хемилюминесценция.

Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции (ХЛ)осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3604» (Россия) (Desole p.et al.; 1983). Определяли время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение (Imax) ХЛ и площадь кривой (S). Для усиления хемилюминесценции использовали активатор – люминол, а в качестве индуктора – зимозан [20–25]. По результатам проведенных исследований в пакете электронных таблиц MS Excel была сформирована база данных. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoftInc., США, 2008).

Для всех данных определяли медиану (Me) и персинтили (C25-C75), статистическую значимость различий определяли с использованием рангового критерия Манна-Уитни.

3 Результаты исследования и их обсуждение

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КРР – колоректальный рак

РТК – рак толстой кишки

НГ – нейтрофильные гранулоциты

АФК – активные формы кислорода

ХЛ – хемилюменесценция

CIN – хромосомнаянестабильность (chromosomicalinstability)

MSI– микросателитнаянестабильность (microsatelliteinstability)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

PMN – полиморфноядерные нейтрофилы

РГП –распространенный гнойный перитонит

АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность

ФНО-а – фактор некроза опухоли

ИЛ-1 – интерлейкин-1

ИНФ-у – интерферон-у

ММП-9, -13 – матриксные металопротеиназы

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1Райков Н .С. , Чупин Р.Н . , Попов И .Н., Сбродов О.В., Дорогина Л.В. , Роговских А.Н. Рак прямой кишки // Тюменский медицинский журнал. – 2010. – №3-4. – С. 75-77.

2 Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология. –2009. –Т. 51, № 6. – С. 467-474.

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. 281-285.

4 Кохнюк, В.Т. Рак прямой кишки в Республике Беларусь: распространенность, диагностика и результаты лечения // Онкологическая колопроктороло гия. – 2013. –№2. – С. 31-34.

5 Кит О.И., Франциянц Е.М., Никипелова Е.А., Комарова Е.Ф. Состояние свободнорадикальных процессов в ткани злокачественной опухоли толстой кишки // Сибирское медицинское обозрение. – 2014. – №1. – С. 30-34.

6 Земсков, А.М. Клиническая иммунология: учебное пособие для студентов медицинских вузов / Земсков А.М. // Под ред. А. М. Земскова. М.: ГЭОТАР - Медиа, 2005. - С 20.

7 Елисеев, В.Г. Гистология / В.Г. Елисеев, Ю.И. Афанасьев// Медицина. - Москва: Медицина, 1983. - С.146.

8 Давыдов М. И., Патютко Ю.И., Личиницер М. Р. , Расулов А. О., Ткачев С.И., Подлужный Д. В. , Алиев В.А. , Татаев И.Ш., Овчинникова А.И. Современная лечебная тактика при раке прямой кишки с синхронными отдаленными метастазами (клиническое наблюдение) // Онкологическая колопроктороло гия. – 2014. – №1. – С. 33-39.

9 Конорев М.Р. Современные представления об иммунной системе, ассоциированной со слизистой оболочкой кишечника / Конорев М.Р. // Иммунопатол.,аллергол, инфектол. – 2010. - № 2. – С. 40-46.

10 Манчук, В.Т. Особенности прогнозирования возникновения инфекционных осложнений после проведения химиотерапии у больных острыми лейкозами. Медицинская иммунология. - 2012. -Т. 14, № 4-5. - С. 403-408.

11 Грачева Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 2. – С. 54-55.

12Galdiero M.R., Garlanda C., Jaillon S., Montovani. A.Tumor associated macrophages neutrophils in tumor progression. JCellPhysiol. 2013. vol. 228, no. 7. pp. 1404–1412.

13 *Давыдов М.И., Аксель Е.М.* Смертность от злокачественныхновообразований // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2010.№ 2. С. 87–117.

14 *Пожарисский К.М.* Экспериментальный анализ морфогенезаи патогенеза эпителиальных опухолей кишечника: Дис. … д-ра мед.наук. Л., 1978. 402 с.

15 Бердюгина О.В., Ершова А.В. Функционально-метаболические особенности фагоцитов крови при разных формахтуберкулезного воспалительного процесса легких // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 1. С. 21–32.

16 Куртасова Л.М., Зуков Р.А., Семенов Э.В. Особенности хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у онкоурологических больных в динамике заболевания // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 6. С. 589–594.

17 Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Шмидт А.Р. Клеточная чувствительность к интерферону-α2 invitro у детейс инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18,№ 1. С. 79–84.

18 Жданова Н. С., Рубцов Н.Б., Минина Ю. М. Терминальные районы хромосом млекопитающих: эволюционный аспект. Генетика. - 2007. Т 43 (7). С.873 – 886.

19 Мальцева В. Н. Респираторный взрыв и особенности его регуляции в периферичесих нейтрофилах при росте опухоли invivo: Автореф. Канд. дис. Пущино. 21 с.

20 Мальцева В. Н. Наблюдение в динамике модификации функциональной активности периферических нейтрофилов и ее регуляции при росте опухоли invivo. Цитология. – 2006. 48 (12). С. 1000-1009.

21 Чекнев С. Б. Амченкова А. М. Взаимосвязь между праймирующим эффектом интерферона и функциональной активностью клеток крови человека. Вопросы вирусологии. – 2016. 47 (2). С. 40-42.

22 Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. - 1989. М.:Наука. С. 341.

23 Воробьев Г.И., ПересадаИ.В., ФилонА.Ф. Результаты трансанальногоэндохирургического удаления ранних форм рака прямой кишки // Колопроктология. – 2010. – № 3. – С. 21–29.

24 TNM: Классификация злокачественных опухолей / под ред. Л.Х. Собина и др.; пер. с англ. и научн. ред. А.И. Щеголев, Е.А. Дубова, К.А. Павлов. – М.: Логосфера, 2011. – 304 с.

25 Клиническая оперативная колопроктология: Руководство для врачей / Под ред. В.Д. Федорова, Г.И. Воробьева, В.Л. Ривкина. – М.: ГНЦ проктологии, 1994. – 432 с.

26 Гамалей И. А., Клюбин И. В. // Цитология. 1996. Т. 38. № 12. С. 1233–1247

27 Состояние онкологической помощи населению России в 2013 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М., 2014. – 80 с.

28 Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями // Успехи биол. химии. — 2013. — Т. 53. — С. 245–296.

29 Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Роль свободнорадикальных процессов и редокс-сигнализации в адаптации организма к изменению

уровня кислорода // Рос. физиол. журн. им. И.И. Сеченова. — 2005. — Т. 91, № 6. — С. 636–655.

30 Киричек Л.Т., Зубова Е.О. Молекулярные основы окислительного стресса и возможности его фармакологической регуляции // Междунар. мед. журнал. — 2004. — № 1. — С. 144–148.

31 Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Роль свободнорадикальных процессов и редокс-сигнализации в адаптации организма к изменению уровня кислорода // Рос. физиол. журн. им. И.И. Сеченова. — 2005. — Т. 91, № 6. — С. 636–655.

33 Valentini V, van Stiphout RG, Lammering G, Gambacorta MA et al. (2011). Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials. J. Clin. Oncol., 29 (23), 3163-3172.

34 Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, [et al.] Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. Blood. – 2010. 115 (2). P. 335-343.

35Buczacki S., Davies R.J., Winton D.J. Stem cells, quiescence and rectal carcinoma: An unexplored relationship and potential therapeutic target // Br. J. Cancer. 2011. Vol. 105 (9). P.1253–1259.

36Ferlay J., Shin H.R., Bray F. [et al.] GLOBOCAN 2012 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. Lyon. France: International Agency for Research on Cancer. - 2012.

37 Okayasu *I.* Development of ulcerative colitis and its associated orectal neoplasia as a model of the organ-specific chronic inflammationcarcinoma sequence // Pathol. Int. 2012. Vol. 62 (6). P. 368–380.

38 Araki H, Katayama N, Yamashita Y, [et al.] Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors. Blood. – 2004. 103(8). P. 2973-2980.

39 Cheong C, Matos I, Choi JH, [et al.] Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(1) dendritic cells for immune T cell areas. Cell. -2010. 143(3). P. 416-429.

40 Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages / CurrProtocImmunol//. - 2008. 83 (14). P. 114-120.

41Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S. et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278, N 38. — P. 36027–36031.

42 Kelso G.F., Porteous C.M., Coulter C.V. et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276, N 7. — P. 4588–4596.

43 Li C., Jakson R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury // Amer.J. Physiol. Cell Physiol. — 2002. — Vol. 282. — P. 227–241.

44 .Silachev D., Pevzner I., Zorova L., Plotnikov E. New generation of penetrating cations as potential agents to treat ischemic stroke // FEBS J. — 2012. — Vol. 279. — P. 364.

45 Smith R.A., Kelso G.F., James A.M., Murphy M.P. Targeting coenzyme Q derivatives to mitochondria // Methods Enzymol. — 2004. — Vol. 382. — P. 45–67

46Urso M.L., Clarkson P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation // Toxicology. — 2003. — Vol. 189. — P. 41–54.

47 Smith R.A., Kelso G.F., James A.M., Murphy M.P. Targeting coenzyme Q derivatives to mitochondria // Methods Enzymol. — 2004. — Vol. 382. — P. 45–67.

48SkulachevV.P. Mitochondria targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases // J. Alzheimers Dis. — 2012. — Vol. 28, N 2. — P. 283–289.

49 Zorov D.B., Filburn C.R., Klotz L.O. et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release, a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocites // J. Exp. Med. — 2000. — Vol. 192. — P. 1001–1014.

50 Ross M.F., Ross T.D., Blaikie F.H. et al. Accumulation of lipophilic dications by mitochondria and cells // Biochem. J. — 2006. — Vol. 400. — P. 199–208.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

кафедра медицинской биологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ _____
подпись инициалы, фамилия
« 5 » июня 20 19 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Особенности респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов
тема
при раке толстого кишечника

06.04.01 Биология

020400.68.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель _____ профессор, д.м.н. Смирнова О. В.
подпись, дата

Выпускник _____ Нурутдинова Ф.Р.
подпись, дата

Рецензент _____ к.б.н., с.н.с. лаборатории клинической патофизиологии НИИ МПС Москаленко О.Л.
подпись, дата

Красноярск 2019