

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

подпись

инициалы, фамилия

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Особенности хемилюминесцентной активности моноцитов  
у больных с раком желудка на ранних стадиях

Руководитель д.м.н., профессор \_\_\_\_\_ Смирнова О.В.

Выпускник ББ16-32Б №041620765 \_\_\_\_\_ Полонник В.В.

Красноярск 2020

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа на тему: «Особенности хемилюминесцентной активности моноцитов у больных с раком желудка на ранних стадиях» содержит 34 страницы и включает в себя 40 литературных источников, 1 таблицу, 4 рисунка.

Ключевые слова: рак желудка, моноциты, хемилюминесценция, спонтанная хемилюминесцентная активность, индуцированная хемилюминесцентная активность.

Цель работы: изучить особенности хемилюминесцентной активности моноцитов на ранних стадиях рака желудка.

Актуальность данной работы заключается в исследовании особенностей функциональной активности моноцитов больных раком желудка и дальнейшего применения этих знаний для разработки методов ранней диагностики рака желудка.

Объектом исследования в данной работе являлись моноциты, полученные из венозной крови, взятой у 100 практически здоровых людей (контрольная группа) и 30 пациентов с раком желудка I и II стадии в возрасте от 28 до 86 лет.

В результате проведённого исследования были получены такие результаты: увеличены время выхода кривой на максимум и площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции моноцитов, а также увеличены площадь под кривой и индекс активации в индуцированном состоянии. Выявлена корреляционная зависимость между начальными стадиями рака желудка и изучаемыми показателями.

## **Содержание**

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
1.1 Клинико-эпидемиологические особенности рака желудка .....	6
1.2 Моноциты, их функции и роль в иммунном реагировании, антигенпрезентирование.....	9
1.3 Хемилюминесценция моноцитов. Метод исследования защитных механизмов клеток .....	11
1.4 Моноциты при злокачественных новообразованиях .....	14
ГЛАВА II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	16
2.1 Объект исследования .....	16
2.2 Иммунологические методы исследования.....	16
2.3 Определение хемилюминесцентной активности моноцитов периферической крови.....	17
2.4 Статистические методы исследования.....	18
ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ .....	19
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	20
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	22
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	23

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

В организме человека моноциты составляют от 3 до 11% от всех лейкоцитов. Несмотря на небольшое количество, они участвуют в ряде важнейших этапов неспецифического иммунного ответа, и вдобавок оказывают косвенное влияние на специфический иммунный ответ [36].

Основной функцией моноцитов в условиях нормы являются контроль целостности кровеносных сосудов и обновление популяции тканевых макрофагов и других клеточных популяций, принимающих участие в поддержании тканевого гомеостаза [38]. При различных патологических процессах, прежде всего, при воспалении, моноциты служат пластическим ресурсом для макрофагов, обеспечивающих элиминацию патогенов и регенерацию поврежденных тканей. Вовлечение моноцитов в реализацию механизмов острого и хронического воспаления позволило предложить использование их характеристик в качестве диагностических маркеров при различных заболеваниях [32].

Участие моноцитов в патогенезе злокачественного роста также связано с пополнением различных клеточных популяций опухолевого микроокружения, таких как опухоль-ассоциированные макрофаги, супрессорные клетки миелоидного происхождения и определенная часть дендритных клеток. В настоящее время значение клеточного состава и функциональной ориентации (поляризации) опухолевого микроокружения для клинического течения онкологических заболеваний и эффективности проводимого противоопухолевого лечения обосновано целым рядом работ. Оценка основных этапов развития и функционирования моноцитов с позиции вовлечения в патогенез злокачественного роста даст возможность выявить критические точки, направляющие дифференцировку моноцита в сторону содействия опухолевому росту и прогрессии. Изучение механизмов, лежащих в основе проопухолевой дифференцировки моноцита, позволит разработать

терапевтические подходы для возможного направленного репрограммирования клеток моноцитарно-макрофагального ряда [30, 40, 21].

**Цели:** Изучить особенности хемилюминесцентной активности моноцитов на ранних стадиях рака желудка.

**Задачи:**

1. Изучить спонтанную хемилюминесцентную активность моноцитов у больных раком желудка на ранних стадиях;
2. Изучить индуцированную хемилюминесцентную активность моноцитов у больных раком желудка на ранних стадиях;
3. Выявить наиболее значимые показатели хемилюминесценции моноцитов, влияющие на прогрессирование рака желудка.

## ГЛАВА I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Клинико-эпидемиологические особенности рака желудка

Рак желудка – это злокачественное образование, происходящее из эпителия слизистой оболочки желудка. Рак является одной из основных причин смерти в мире; так, в 2018 г. (по данным ВОЗ) от этого заболевания умерли 9,6 млн человек, в том числе от рака желудка – 1,03 млн случаев [33].

Рак желудка является одной из самых актуальных проблем онкологии в России. Каждый год от этой патологии умирают около 40 тысяч россиян, а регистрируется примерно 49 тысяч новых случаев этого заболевания в год, что составляет около 11% от всех злокачественных опухолей [6, 11].

Для рака желудка характерна региональная вариабельность. Заболеваемость РЖ населения региона Сибири и Дальнего Востока соответствует РФ. Восточная Сибирь, а в частности Красноярский край, относится к территории повышенного риска. Также у мужчин РЖ встречается в 2,5 раза чаще, чем у женщин, но проявляется это только после 35 лет. Средний возраст заболеваемости мужчин – 62 года, женщин – 65 лет [17, 23].

Показатели пятилетней выживаемости после существенных вмешательств обычно не превышают 36 %. Так происходит, потому что более чем у 70 % впервые выявленных больных рак желудка обнаруживается на III–IV стадии, отдаленные результаты лечения данного заболевания продолжают оставаться неудовлетворительными [13].

В большинстве случаев рак желудка возникает случайно при участии внешних факторов риска, включая особенности питания, образ жизни и, конечно же, инфекцию *Helicobacter pylori*. Однако приблизительно 5–10% больных с РЖ имеют отягощенный онкологический семейный анамнез. Это, равным образом, предполагает генетическую предрасположенность к развитию таких форм рака желудка, как перстневидно-клеточный рак и низкодифференцированная аденокарцинома [6, 16].

Более 95% карцином желудка относятся к аденокарциномам. Оставшийся процент составляют лейомиосаркома, аденоканкроид, карциноидные опухоли и

плоскоклеточная карцинома. Ранний РЖ определяется как расположенная в слизистой и подслизистой оболочках опухоль, независимо от метастазирования в регионарные лимфатические узлы. Разграничить такой рак от «предраковых» поражений может быть довольно затруднительно на гистологических препаратах, даже при биопсии желудка. «Симптомы заболевания минимальны, диагноз часто ставится при скрининговой эндоскопии и при эндоскопии по несвязанным симптомам. Повреждения обычно аденомами с признаками, похожими на рак продвинутой стадии» [1, 20].

Существует модель развития рака желудка, предложенная P.Correa, по которой к данному заболеванию ведет ряд патологических процессов в слизистой оболочке желудка: нормальная слизистая оболочка → неатрофический гастрит → атрофический гастрит → кишечная метаплазия → дисплазия → карцинома кишечного типа. Однако приведённая схема наиболее характерна для рака кишечного типа, т.к. для рака диффузного типа такие предварительные изменения неизвестны. Выделяют два основных типа кишечной метаплазии: тонкокишечная и толстокишечная. Развитие опухоли связано с толстокишечной (неполной) кишечной метаплазией, т.к. это доказано молекулярно-генетическими исследованиями [2, 16].

Самый распространенный тип рака желудка – это язвенно-инфильтративная форма, размер которой может варьировать от 1 см до опухоли, занимающей почти весь желудок. Часто опухоль возникает сквозь стенку желудка, захватывает поджелудочную железу и сальник, дает метастазы в региональные лимфатические узлы, печень и полость брюшины. Некоторые опухоли обладают полиповидным ростом, выступая в просвет желудка, уже позднее захватывая его стенку и прилегающие ткани [19, 20].

Другие опухоли могут располагаться поверхностно по слизистой оболочке, обходя региональные лимфатические узлы до поздних этапов болезни, такие опухоли имеют лучший прогноз. В других случаях присутствуют диффузный склероз всей стенки желудка. Желудок при этом маленький, сокращенный и не расширяется. Такие опухоли имеют особенно

плохой прогноз. Опухоли чаще возникают в антруме или нижней трети желудка, наиболее часто на малой кривизне. Некоторые из таких опухолей многоцентровые. Их локализация меняется со временем, с увеличением проксимальных опухолей и снижением их в антруме [6, 20].

На микроскопическом уровне наиболее полезное разделение проведено между карциномами, клетки которых похожи на клетки кишечника, при этом опухоль окружена интестинальной метаплазией (кишечный тип), и теми, которые имеют тенденцию к инфильтрированию стенки желудка и окружены нормальной слизистой (диффузный тип). Опухоли кишечного типа связывают с лучшими показателями выживаемости, они больше встречаются у больных пожилого возраста, наиболее вероятно, что им предшествовал атрофический гастрит [13, 20, 18].

В популяциях с высоким риском заболевания раком желудка (таких, как в Японии) большинство опухолей относятся к этому типу. Карциномы диффузного типа чаще возникают у женщин, связаны с группой крови А, показатели суммарной выживаемости при них хуже. Опухоли из париетальных клеток являются редкими [16, 20].

В Японии в результате скрининговых программ большое число опухолей диагностировано на ранних стадиях. Термин «начальный рак желудка» введен для опухолей, расположенных только в слизистой или подслизистой оболочках. Такие опухоли могут относиться к кишечному или диффузному типу с разной степенью дифференцировки. На этой стадии прогноз великолепный, более 90% больных живут более 5 лет. Лимфатическое распространение опухоли идет через поверхностную лимфатическую сеть в узлы левой желудочной цепи, в селезеночную и печеночную цепи вдоль основных сосудов, питающих желудок [3, 20].

Далее распространение продолжается в узлы чревного ствола, в селезеночную цепь и печеночную цепь вокруг ворот печени. Иногда отмечается увеличение узлов в левой надключичной области глубоко к грудиному месту прикрепления (узел Вирхова). Рак желудка также локально распространяется



сквозь стенку желудка в сальник, печень и поджелудочную железу. Фрагменты опухоли могут обрабатываться и рассеиваться широко по перитонеальному пространству, вызывая злокачественные асциты и опухоли Крукенберга на поверхности яичников. Метастазы, переносимые с кровью, особенно часты в печени, но также встречаются метастазы в легких. Нечасто происходят метастазы в кости, метастазы в центральную нервную систему являются редкими [3].

Несмотря на некоторые успехи комбинированных методов лечения РЖ, именно хирургический метод остается стандартом, позволяющим добиться полного излечения (ВОЗ). Современная хирургическая стратегия по отношению к РЖ включает выполнение радикальной операции с применением комбинированных резекций и расширенных лимфодиссекций (ЛД) [7, 13].

Принципы хирургического лечения больных РЖ достаточно четко проработаны и описаны. Основными принципами оперативного лечения РЖ являются: максимальная безопасность вмешательства, онкологическая адекватность и высокая функциональность. Радикальная резекция опухоли (R0 резекция) служит главным фактором в сокращении локальных рецидивов РЖ, но эта цель может быть достигнута только при условии безопасного, с онкологической точки зрения, уровня резекции, резекции «enblock» и радикальной ЛД [5, 13].

## **1.2 Моноциты, их функции и роль в иммунном реагировании, антигенпрезентирование**

Моноциты – это разновидность лейкоцитов, которые борются с определенными инфекциями и помогают другим лейкоцитам удалять погибшие или поврежденные ткани, разрушать злокачественные клетки и регулировать иммунитет, защищающий организм от чужеродных веществ. Моноциты имеют бобовидное ядро; они являются предшественниками макрофагов. Моноциты, как и макрофаги, являются основными клетками системы фагоцитирующих

мононуклеаров (ВОЗ) или макрофагальной системы И. И. Мечникова [12, 31, 37].

Моноциты берут начало от гранулоцитарно-моноцитарной клетки-предшественницы, а макрофаги – от моноцитов, переходящих из кровяного русла в ткани. Сформировавшись в костном мозге, моноцит находится там от 30 до 60 ч. После этого он делится и поступает в системный кровоток. Период циркуляции моноцита в крови составляет приблизительно 72 ч, где, достигнув зрелости, превращается в тканевый макрофаг (гистиоцит). Ядро моноцита трансформируется из круглого сначала в бобовидное, а затем в лапчатое. Помимо этого, отмечается изменение структуры генетического материала клетки. Цвет цитоплазмы моноцита может быть совершенно различным – от базофильного до серо-голубого или даже розоватого. После выхода из кровяного русла моноцит больше не может вернуться в системную циркуляцию [12, 24].

Моноциты – самые крупные клетки периферической крови. Они обладают выраженной фагоцитарной функцией и способны фагоцитировать микробы в кислой среде, когда нейтрофилы не активны. Фагоцитируя микробы, погибшие лейкоциты, поврежденные клетки тканей, моноциты очищают место воспаления и подготавливают его для регенерации. Моноциты синтезируют отдельные компоненты системы комплемента. Активированные моноциты и тканевые макрофаги продуцируют цитотоксины, интерлейкин (ИЛ-1), фактор некроза опухолей (ФНО), интерферон, тем самым, осуществляя противоопухолевый, противовирусный, противомикробный и противопаразитарный иммунитет; участвуют в регуляции гемопоэза. Макрофаги принимают участие в формировании специфического иммунного ответа организма. Они распознают антиген и переводят его в так называемую иммуногенную форму (презентация антигена). Моноциты продуцируют как факторы, усиливающие свертывание крови (тромбоксаны, тромбопластины), так и факторы, стимулирующие фибринолиз (активаторы плазминогена) [24, 14].

Фагоцитоз – одна из основных систем защиты организма, одно из звеньев иммунитета. В моноцитах и макрофагах его ферменты, так же как многие другие структуры, подчинены роли данных кровяных клеток в иммунитете и в первую очередь – фагоцитарной функции [12].

Макрофаги обладают способностью переваривать не только бактериальные клетки, эритроциты и тромбоциты, на которых фиксированы некоторые компоненты комплемента, в том числе стареющие или патологически измененные, но также и опухолевые клетки. Такой вид активности макрофагов получил название тумороцидной. Из этого нельзя сделать вывод о действительной борьбе макрофагов с опухолью, а именно «признании» ими такого типа клеток как чужеродной ткани, в связи с тем что в любой опухоли присутствует очень много стареющих клеток, подлежащих фагоцитозу аналогично всем неопухолевым стареющим клеткам [12, 14].

Доказана макрофагальная природа остеокластов. Макрофаги способны, во-первых, непосредственно растворять костную ткань, во-вторых, стимулировать продукцию остеокластстимулирующего фактора Т-лимфоцитов. Данная функция макрофагов может оказаться ведущей в патологии, обусловленной опухолевой и реактивной пролиферацией макрофагов [12, 24].

### **1.3 Хемилюминесценция моноцитов. Метод исследования защитных механизмов клеток**

Термином клеточная хемилюминесценция обозначается хемилюминесцентное свечение, связанное с образованием свободных радикалов отдельными типами клеток и обусловленное специфическим ответом этих клеток на определенный раздражитель или стимул [9].

Метод клеточной хемилюминесценции применяется в основном для оценки функционального состояния фагоцитирующих клеток крови (нейтрофилов, моноцитов и др.) и заключается в том, что специфическим ответом этих клеток на стимул или раздражитель является увеличение

продукции свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) – кислородный взрыв [9].

Выраженность хемилюминесцентного ответа на клеточный стимул или раздражитель зависит как от состояния самих фагоцитирующих клеток, так и от специфичности используемого стимула или раздражителя [22].

Метод клеточной хемилюминесценции может быть использован для решения следующих научных и прикладных задач:

1. Определение текущего состояния клеток – находятся ли клетки (например, фагоцитирующие клетки крови) в "спокойном" или активированном состоянии.
2. Динамическое наблюдение за состоянием организма – мониторинг степени активации клеток в ходе лечения или обострения заболеваний.
3. Определение способности клеток к специфической активации – обнаружение ответных клеточных реакций на различные токсины, аллергены, промышленные пыли и др [9, 22].

Как происходит активация хемилюминесценции? Если собственное свечение биологической пробы является очень слабым, то при активации некоторых соединений оно многократно усиливается, и интенсивности потока становится достаточной для регистрации ее с помощью специальных флуориметрических детекторов. При этом в пробе могут происходить процессы двух типов: химические или физические [8].

Химические активаторы хемилюминесценции - это соединения, вступающие в химические реакции с активными формами кислорода или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы, находящиеся в нестабильном возбужденном электронном состоянии. При переходе молекул в свое обычное состояние происходит выброс фотонов и свечение. Хорошо известные представители таких активаторов - это люминол (3-аминофталевый гидразид) и люцигенин - бис-N-метилакридиний. Под действием окислителя (радикала гидроксила) происходит образование радикала люминола, который затем вступает в реакцию с супероксидным радикалом,

образуя внутреннюю перекись (диоксид). Ее разложение приводит к образованию возбужденной молекулы 3-аминофталата. Переход этой молекулы в основное состояние сопровождается испусканием кванта света [8, 9].

Физические активаторы не вступают в химические реакции и не влияют на ход реакций, сопровождающихся свечением, но, тем не менее, многократно усиливают интенсивность хемилюминесценции. В основе их действия лежит физический процесс переноса энергии с молекулы продукта хемилюминесцентной реакции на активатор. К физическим активаторам можно отнести некоторые люминесцирующие соединения, применяемые при цепном окислении липидов. В настоящее время еще не изучено до конца, какие именно соединения могут быть применены, и в лабораториях, занимающихся проведением данного вида исследований, ведутся работы по их поиску. Оказалось, что некоторые красители и комплексы редкоземельных элементов обладают способностью многократно усиливать интенсивность такой хемилюминесценции. Самым эффективным активатором оказались производные кумарина, которые усиливали реакцию хемилюминесценции в 1500 раз [8].

Активированная хемилюминесценция применяется при обнаружении фагоцитов и исследовании защитных механизмов клеток. Некоторые клетки организма - гранулоциты и моноциты крови и тканевые макрофаги для борьбы с чужеродными клетками выделяют, так называемые, активные формы кислорода (супероксидный радикал - пероксид водорода и радикал гидроксила). При активации этой реакции люминолом регистрируется свечение большой интенсивности. Усиление свечения наблюдается при возникновении в организме очагов воспаления (например, после инфаркта миокарда или у больных семейной гиперхолестеринемией (при этой наследственной болезни в крови содержится много холестерина и имеется выраженная предрасположенность к раннему развитию атеросклероза) [22].

#### **1.4 Моноциты при злокачественных новообразованиях**

В клинических исследованиях у пациентов со злокачественными новообразованиями выявлено повышение количества циркулирующих в периферической крови моноцитов, которые представляют собой неоднородный пул клеток, отличающихся по своим фенотипическим и функциональным свойствам [15, 29].

Соотношение основных фракций моноцитов при определенных локализациях злокачественных новообразований изменяется. Так, при раке желудка установлено четырехкратное увеличение количества клеток моноцитарной субпопуляции CD16+ и CD14+16+ по сравнению со здоровыми лицами. Оперативное удаление опухоли приводит к снижению количества CD16+ в крови [15, 34].

Существует гипотеза о том, что моноциты, находясь в периферической крови, могут быть подвержены дистантному воздействию, вследствие чего они могут формировать фенотип, подобный макрофагам, поляризоваться по типу макрофагов, которые способствуют васкуляризации опухолевой ткани, образованию метастазов, иммуносупрессии, либо активировать стволовые опухолевые клетки [26].

Связь моноцитов, циркулирующих в крови, и макрофагов, реализующих свою функцию в ткани, наиболее вероятно опосредована феноменом неспецифической иммунологической памяти [25]. Этот механизм заключается в том, что моноциты под действием системных факторов, появляющихся в циркуляции при наличии локального воспаления, приобретают определенный эпигенетический профиль, в частности за счет механизмов метилирования, который оказывает влияние на их дальнейшую дифференцировку в очаге патологического процесса [28, 39, 27].

Несмотря на ряд эффектов, таких как осуществление фагоцитоза и регуляторных функций посредством цитокинов, которые моноциты осуществляют в кровотоке, основная их функция – это миграция и последующая направленная дифференцировка в тканях [15].

Развитие злокачественного новообразования приводит к вовлечению моноцитов в пополнение популяции тканевых макрофагов.

Результаты ряда исследований подтверждают возможность использования моноцитов для противоопухолевой иммунотерапии, при этом помимо применения в вакцинотерапии, моноциты могут сами выступать в роли мишеней для терапевтических воздействий, как системно, так и *ex vivo* [15].

## **ГЛАВА II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Объект исследования**

Отбор больных проводился на базе Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского, отбор контрольной группы – в Красноярском Краевом Центре крови №1.

Исследование проводилось с разрешения этического комитета ФГБНУ ФИЦ КНЦ СО РАН «НИИ медицинских проблем Севера», каждый участник исследования подписал форму добровольного информированного согласия. Материалом исследования служила венозная кровь, которую брали у пациентов из локтевой вены в вакуумные пробирки с литий гепарином утром натощак.

### **2.2 Иммунологические методы исследования**

Выделение общей фракции лимфоцитов и моноцитов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина. В стеклянную пробирку для центрифуги отмеряется 2 мл фикола, плотностью 1,119. Затем наслаивается 2 мл фикола с плотностью 1,077. Поверх наслаивается 6-6,5 мл крови. Центрифугируется 40мин на 1500 оборотах. Получаем расслоение по фракциям: плазма, моноцитарно-лейкоцитарное кольцо, фикол, нейтрофильное кольцо, эритроциты. В пластиковую чашку Петри механической пипеткой отбираем моноцитарно-лимфоцитарное кольцо с добавлением 5 мл раствора питательной среды 199 (“ПанЭко”, Россия). Инкубируются при температуре 37 С 60 мин. Над осадочную жидкость забирают пипеткой не касаясь дна чашки Петри. В чашечку добавить 5 мл раствора Вернеса (“ПанЭко”, Россия), полностью закрыв дно чашечки. Закрывать крышкой и инкубировать в холодильнике 20 минут. После инкубирования пластмассовым скребком аккуратно собрать моноциты со дна и перенести раствор в пробирку. Подсчёт клеток производится в Камере Горяева. В зависимости от результатов производится разведение до концентрации 1 млн. клеток на 1 мл раствора.



### **2.3 Определение хемилюминесцентной активности моноцитов периферической крови**

Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 200 мкл взвеси моноцитов (1 млн/мл), 50 мкл люминола (“Sigma”, США) в концентрации 10<sup>-5</sup> М, 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 240 мкл раствора Хэнкса (“ПанЭко”, Россия) для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хэнкса – для индуцированной. Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе “CL3606” (СКТБ “Наука”, Красноярск). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T<sub>max</sub>), максимальное значение интенсивности (I<sub>max</sub>), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной (Синд./ Спонт.) и определяли как индекс активации.

Результаты ХЛ анализа характеризовали по следующим параметрам: время выхода на максимум интенсивности ХЛ, значение максимума интенсивности ХЛ, площадь под кривой ХЛ. Определили индекс чувствительности хемилюминесценции (ИА)- отношением площади кривой хемилюминесценции индуцированной зимозаном к спонтанной хемилюминесценции. Индекс активации определяли по формуле:

$$\text{ИА} = \text{Синдуцированная} / \text{Спонтанной},$$

Синдуцированная – величина площади под кривой хемилюминесценции индуцированной зимозаном (относительных единиц).

Спонтанная – величина площади под кривой хемилюминесценции не индуцированная (относительных единиц).

## 2.4 Статистические методы исследования

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MSExcel 2010 была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакета прикладных программ и Statistica 8,0 производился статистический анализ. Выборку описывали с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C25 и C75). Статистическую значимость различий определяли с использованием рангового критерия Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Пирсону (r). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

### **ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ**

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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. У пациентов с раком желудка I и II стадии наблюдалось увеличение хемилюминесцентной активности моноцитов в спонтанном состоянии, вероятно, обусловленное влиянием злокачественного опухолевого фактора. Выявлены показатели, которые напрямую зависят от стадии развития рака желудка: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции и площадь под кривой хемилюминесценции. Увеличение времени выхода на максимум хемилюминесценции отражает время необходимое для развития «дыхательного взрыва» в моноцитах: от момента индукции до полной активации ферментов синтеза активных форм кислорода. Однако, несмотря на то, что моноцитам больных людей требуется больше времени для активации, с прогрессированием заболевания значительно увеличиваются возможности для реализации их функций.

2. В индуцированном состоянии у больных с раком желудка I и II стадии выявлены следующие изменения в сравнении с контрольной группой: увеличены площадь под кривой хемилюминесценции и индекс активации. Увеличение площади под кривой свидетельствует о повышенной суммарной генерации АФК моноцитами больных РЖ. А индекс активации моноцитов, превышающий показатели практически здоровых людей, говорит об усиленном синтезе АФК при функциональной активности. Исходя из этого, можно предположить, что повышенный уровень «респираторного взрыва» в моноцитах больных раком желудка на ранних стадиях несёт диагностическую ценность для практической оценки.

3. Результаты проведенного исследования установили особенности взаимоотношений между стадиями рака желудка и показателями хемилюминесцентной активности моноцитов, определяемые направленностью и силой корреляционных связей. Выявлены положительные корреляционные связи между начальными стадиями рака желудка и площадью под кривой спонтанной хемилюминесценции, площадью под кривой зимозан-индуцированной хемилюминесценции и индексом активации. Следует

отметить, что полученные нами данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения метаболических механизмов, лежащих в основе функциональной активности разных субпопуляций моноцитов, а также о необходимости определить, какое клиническое значение имеют их изменения у больных с раком желудка на ранних стадиях.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ИА – индекс активации

РЖ – рак желудка

СХЛ – спонтанная хемилюминесценция

ХА – хемилюминесцентная активность

ХЛ – хемилюминесценция

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абакумова, Т.В. Физиология крови: учеб.пособие к практическим занятиям по нормальной физиологии человека для студентов медицинского факультета / Т.В.Абакумова, Т.П.Генинг, Н.Л.Михайлова, Д.Р.Долгова, Л.В.Полуднякова // Ульяновск: УлГУ. – 2017. – С. 58.
2. Антоненкова, Н. Н. Онкология : учеб. пособие / Н. Н. Антоненкова [и др.]; под. общ. ред. И. В. Залуцкого. – Минск : Выш. шк., 2007. – С. 703.
3. Арямкина, О.Л. Гастроэнтерология, гепатология / О.Л. Арямкина // Ульяновский Государственный Университет. – 2017.
4. Ашихмина, Т.В. Методы математической статистики обработки результатов выпускной квалификационной работы: Учебное пособие / Т.В. Ашихмина, Н.А. Бушмелева, З.В. Шилова // Scientific magazine "Kontsept". – 2014. – С. 68-69.
5. Бакулин, И. Г. Профилактика и ранняя диагностика рака желудка / И. Г. Бакулин [и др.] // Доказательная гастроэнтерология. – 2018. – Т. 2. – С. 44-58.
6. Белковец, А.В. Наследственный рак желудка / А.В.Белковец, С.А.Курилович, О.В.Решетников // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований «Медицинские науки». – 2016. – №1. – С.516-522.
7. Борбашев, Т. Т. Расширенные и расширенно-комбинированные хирургические вмешательства при осложненном раке желудка (обзор литературы) / Т. Т. Борбашев, М. Ю. Харитонов // Вестник КРСУ. Профилактическая медицина. – 2016. – Т. 16, № 11. – С. 102-110.
8. Васильев, Р.Ф. Химическое свечение / Р.Ф.Васильев // Химия и Химики. – 2010. – №1. – С.5-62.
9. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемиллюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // Успехи биологической химии. - 2009. - Т. 49. - С. 341-388.

10. Давыдов, М. И. Современная стратегия хирургического лечения рака желудка / М. И. Давыдов, М. Д. Тер-Ованесов // Современная онкология. - 2000. - Т. 2, № 1. - С. 160;
11. Давыдов, М.И. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2006 г. / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2008. – Т. 19. – №2 (прил.1). – С. 53.
12. Дроздов, А.А. Заболевания крови / А.А. Дроздов, М.В.Дроздова // «Научная книга» – 2008.
13. Короткова, Е.А. Рак желудка. Молекулярно-биологические особенности. / Е.А. Короткова, А.А. Иванников, Н.А. Огнерубов, Е.С. Герштейн, В.Л. Чанг // Вестник ТГУ. – 2014. – Т.19. – №3.
14. Парахонский, А.П. Участие моноцитов-макрофагов в регенерации тканей / А.П. Парахонский // Sciences of Europe. – 2018. – №29-1. – С. 51-60.
15. Патышева, М.Р. Моноциты при злокачественных новообразованиях: перспективы и точки приложения для диагностики и терапии / М.Р. Патышева, М.Н. Стахеева, И.В. Ларионова, Н.А. Тарабановская, Е.С. Григорьева, Е.М. Слонимская, Ю.Г. Кжысковска, Н.В.Чердынцева // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – №18 (1). – С.76–83.
16. Пегашева, И.Л. Предикторы развития рака желудка: предраковые изменения слизистой оболочки желудка (кишечная метаплазия и дисплазия), факторы патогенности *Helicobacter pylori* (Cag A, Vac A) / И.Л. Пегашева, И.М. Павлович, А.В. Гордиенко // Вестник Российской Военно-Медицинской Академии. – 2017. – №4. – С.147-152.
17. Писарева, Л.Ф. Рак желудка в регионе Сибири и Дальнего Востока / Л.Ф. Писарева, А.П. Бояркина, И.В. Ушакова // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – №3. – С. 36-43.
18. Сальникова, М.М. Метаболические и гормональные особенности перстневидноклеточного рака желудка / М.М. Сальникова // 2012.



19. Смирнова, О. В. Патофизиология : учеб. пособие : в 2 ч. Ч. 2 / О. В. Смирнова, Е. И. Шишацкая, А. В. Барон // Красноярск : Сиб. федер. ун-т. – 2019. – С. 96.
20. Соухами, Р. Рак и его лечение / Р. Соухами, Дж. Тобайас // пер. 5-го англ. изд. под общ. ред. проф., д-ра мед. наук А. М. Сдвижкова. — 2017.
21. Таширева, Л.А. Типы иммуновоспалительных реакций как алгоритмы взаимодействия клеток в условиях репаративной регенерации и опухолевого роста / Л.А. Таширева, В.М. Перельмутер, В.Н. Манских, Е.В. Денисов, О.Е. Савельева, Е.В. Кайгородова, М.В. Завьялова // Биохимия. – 2017. – Т.82 №5. – С.542–555.
22. Теплякова, О.В. Способ определения функциональной способности фагоцитирующих клеток / О.В. Теплякова, Ю.С. Винник, А.А. Савченко, О.А. Коленчукова, Н.И. Цедрик, О.В. Перьянова, О.Е. Хохлова, М.Ю. Юрьева // Описание изобретения к патенту. – 2012.
23. Ушакова, И.В. О заболеваемости раком желудка населения Сибири и Дальнего востока / И.В. Ушакова, А.П. Бояркина // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – №S1. – С. 199-200.
24. Шошина, И. И. Физиология. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : конспект лекций / И. И. Шошина, Ф. А. Гершкорон, Е. В. Инжеваткин // Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ – 2008.
25. Adams, D.L. Circulating cancer-associated macrophage-like cells differentiate malignant breast cancer and benign breast conditions / D.L. Adams, D.K. Adams, R.K. Alpaugh, M. Cristofanilli, S.S. Martin, S. Chumsri, C.M. Tang, J.R. Marks // Cancer Epidemiol. – Biomarkers Prev. – 2016. – V.25 №7. – P.1037-1042.
26. Adams, D.L. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. / D.L. Adams, R.K. Alpaugh, M. Charpentier, S.S. Martin, M. Cristofanilli, S. Chumsri, C.M. Tang // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – V.111 №9. – P.3514–3519.

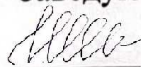
27. Baj-Krzyworzeka, M. Interactions of human monocytes with TMVs (tumour-derived microvesicles). / M. Baj-Krzyworzeka, J. Baran, R. Szatanek, B. Mytar, M. Siedlar, M. Zembala // *Biochem. – Soc. Trans.* – 2013. – V.41 №1. – P.268-272.
28. Biswas, S.K. Macrophages: biology and role in the pathology of diseases / S.K. Biswas, A. Mantovani // *New York: Springer.* – 2014. – P.7-11.
29. Ginhoux, F. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis / F. Ginhoux, S. Jung // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – V.14 №6. – P.392–404.
30. Grivennikov, S. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection / S. Grivennikov, M. Karin // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2010 February. – V.20 №1. – P.65.
31. Janeway, C.A. Jr *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5th edition. / C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport et al // *New York: Garland Science.* – 2001.
32. Kzhyshkowska, J. Perspectives for monocyte/macrophage-based diagnostics of chronic inflammation / Kzhyshkowska J., Gudima A., Moganti K., Gratchev A., Orekhov A. // *Transfus. Med. Hemother.* – 2016. – V.43 №2. – P.66-77.
33. Torre L. A. Global cancer statistics / L. A. Torre [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2015. – Vol. 65, № 2. – P. 87-108.
34. Tsutsui, S. Angiopoietin-2 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: its relationship to the VEGF expression and microvessel density. / Tsutsui S., Inoue H., Yasuda K., Suzuki K., Takeuchi H., Nishizaki T., Higashi H., Era S., Mori M. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2006. – V.98 №3. – P.261–266.
35. Weber, G. R. The Measurement of Oxygen-Derived Free Radicals and Related Substances in Medicine / G. R. Weber // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* — 1990. — Vol. 28. — P. 569–603.
36. Williams, M.J. Drosophila hemopoiesis and cellular immunity / M.J. Williams, *J. Immunol* // 2007. – V.178 №8. – P.4711–4716.

37. World health statistics / M. Ali, K. Aseel, E. Bertherat et al.; ed. T. Waddell. // [Electronic Resource]. – 2014. – P.180. – URL: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671_eng.pdf) (date accessed: 15.04.2020).
38. Wynn, T.A. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. / Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. // *Nature*. – 2013. – V.496 №7446. – P.445–455.
39. Zhao, L. Human monocytes undergo functional re-programming during differentiation to dendritic cell mediated by human extravillous trophoblasts / Zhao L., Shao Q., Zhang Y., Zhang L., He Y., Wang L., Kong B., Qu X. // *Sci. Rep.* – 2016. – V.6 №1. – P.204-209.
40. Zitvogel, L. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens / Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2011. – V.8 №3. – P. 151–160.

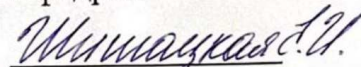
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



подпись



инициалы, фамилия


« 3 » июля 2020 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Особенности хемилюминесцентной активности моноцитов  
у больных с раком желудка на ранних стадиях

Руководитель д.м.н., профессор



Смирнова О.В.

Выпускник ББ16-32Б №041620765



Полонник В.В.

Красноярск 2020