

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
институт
Кафедра Медицинской биологии
Кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Е. И. Шишацкая

подпись инициалы, фамилия

« ____ » _____ 2020г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Состояние респираторного взрыва нейтрофилов

при онкологических заболеваниях

тема

Руководитель профессор, д.м.н.
подпись, дата должность, ученая степень

Савченко А.А.

Выпускник _____
подпись, дата

Сараева К.Р.

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме “Состояние респираторного взрыва нейтрофилов при онкологических заболеваниях” содержит 2 таблицы, 38 страниц текстового документа и 41 источник использованной литературы.

Ключевыми словами по данной теме являются: хемиллюминесценция, рак почки, нейтрофильные гранулоциты, респираторный взрыв, фагоцитоз, синтез АФК.

Цель работы: изучить особенности респираторного взрыва в нейтрофилах крови у людей больных раком почки и здоровых людей.

Проводилась оценка фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов у людей больных раком почки и здоровых людей методом хемиллюминесценции. Был проведен анализ и сравнение полученных результатов.

Для адекватной оценки функциональной активности нейтрофилов и синтеза ими АФК, у больных раком почки, были изучены и проанализированы параметры люминол- и люцигенин-зависимой хемиллюминесценции. Результаты проведенного исследования выявили изменения показателей хемиллюминесценции нейтрофилов периферической крови у людей больных раком почек в сравнении с показателями контрольной группы, а именно увеличение максимума интенсивности свечения при спонтанной люминол-зависимой ХЛ, а также увеличение максимума интенсивности свечения и площади под кривой при зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой ХЛ. Было выявлено, что у людей страдающих раком почки интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов крови выше, чем у здоровых людей.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Обзор литературы.....	6
1.1 Роль иммунной системы в патогенезе рака почки.....	6
1.2 Опухолевые заболевания, их причины и особенности опухолевых клеток.....	8
1.3 Роль нейтрофилов в онкологических заболеваниях	11
1.3.1 Взаимосвязь функциональной активности и метаболизма нейтрофильных гранулоцитов	13
1.4 Респираторный взрыв	15
1.4.1 Роль респираторного взрыва при опухолевом процессе	16
1.4.2 Активные формы кислорода и их роль в онкологических заболеваниях.....	17
1.4.3 Синтез АФК в процессе респираторного взрыва фагоцитирующих клеток.....	20
1.5 Метод хемилюминесценции.....	23
2 Материалы и методы.....	25
2.1 Материалы исследования	25
2.2 Определение хемилюминесцентной активности нейтрофилов	26
2.3 Статистические методы исследования	26
3 Результаты и обсуждение	27
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	32
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	34
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	35

ВВЕДЕНИЕ

По показателям заболеваемости и смертности онкологические заболевания располагаются на втором месте, уступая только сердечно-сосудистым заболеваниям, а к 2030-му году, возможно, выйдут на первое место. Российская современная статистика злокачественных новообразований, говорит о том, что от рака умирает более 300 тысяч человек в год. Кроме того, эта цифра увеличивается с каждым годом[1].

В мире каждый седьмой случай смерти связан с раком. Рак вызывает больше смертей, чем синдром приобретенного иммунодефицита, туберкулез и малярия вместе взятые. Современные тенденции также свидетельствуют о том, что рак будет оставаться одной из основных причин смерти и самым важным препятствием для увеличения продолжительности жизни во всем мире[2].

Внимание многих ученых привлечено к изучению того, как иммунная система реагирует на развивающуюся опухоль в организме и уничтожает ее. Нейтрофилы являются наиболее распространенными лейкоцитами в крови и считаются первой линией защиты при воспалении, инфекциях и раке. Также, нейтрофилы обнаруживаются, проникая во многие виды опухолей. Связанные с опухолью нейтрофилы играют важную роль в злокачественных заболеваниях[3].

Роль нейтрофилов в раке является многофакторной и до конца не изучена. Нейтрофилы отражают состояние воспаления хозяина, которое является отличительной чертой рака. Они могут участвовать в различных стадиях онкогенного процесса, включая инициацию опухоли, рост, пролиферацию или распространение метастазов. Кроме того, нейтрофилы секретируют хемокины и цитокины, вовлекают другие клетки с противоопухолевой активностью. Также, в гранулах нейтрофилов содержатся антимикробные и цитотоксические соединения, способные разрушать злокачественные клетки[4].

Метаболизм и иммунная система зависят друг от друга. При нарушении процессов иммунной системы как следствие возникает нарушение процессов метаболизма.

Во время фагоцитоза опухолевых клеток фагоциты нашей врожденной иммунной системы увеличивают потребление кислорода за счет активности NADPH-оксидазы, которая генерирует супероксидный анион (O_2^-) и перекись водорода (H_2O_2). Эти метаболиты кислорода приводят к появлению других активных форм кислорода, которые обладают сильным антимикробным действием, но могут также вызывать повреждение, разрушая окружающие ткани и вызывая апоптоз в других иммунных реактивных клетках[5].

Таким образом, большое значение в диагностике и лечении рака является применение методов измерения образования и высвобождения продуктов окислительного взрыва. Среди этих методов имеет важное значение хемилюминесценция, усиленная люминолом / люцигенином.

Целью исследования является изучить особенности респираторного взрыва в нейтрофилах крови у людей больных раком почки и здоровых людей.

Задачи:

- Изучить фагоцитарную активность нейтрофилов здоровых людей
- Изучить фагоцитарную активность нейтрофилов людей больных раком почки
- Установить особенности хемилюминесцентной активности нейтрофилов при раке почки в сравнении со здоровыми людьми.

1 Обзор литературы

1.1 Роль иммунной системы в патогенезе рака почки

Рак почки (почечно-клеточный рак) - это гетерогенная группа злокачественных опухолевых заболеваний, которая состоит из ряда различных типов рака, каждый из которых имеет разную гистологию, различное клиническое течение и по-разному реагирует на терапию. Почки выполняют очень важные функции в организме человека, такие как регуляция электролитов, баланса жидкости и кислотно-щелочного баланса в организме, а также выведение из организма продуктов обмена. Таким образом, такие заболевания, как рак почки, ставят под угрозу способность почек выполнять свои функции и приводят к последствиям для всего организма[6].

Рак почки относится к числу наиболее тяжелых онкоурологических заболеваний. По распространенности рак почки у мужчин находится на седьмом месте, а у женщин на девятом. Увеличение показателей заболеваемости этим видом рака объясняется определенными изменениями в окружающей среде и образе жизни людей. Кроме того, существуют данные о том, что уровень заболеваемости раком почки варьируется географически. По данным на 2018 год ежегодно в мире регистрируют примерно 210–250 тыс. новых случаев заболевания почечно-клеточного рака, что составляет 2–3 % в структуре злокачественных новообразований у взрослых[7].

По статистике в России рак почек занимает второе место среди опухолей мочеполовой системы. А также, рак почек характеризуется высокими темпами прироста. Кроме того, стоит отметить, что рак почки чаще всего диагностируют на поздней стадии. Существуют данные о том, что в результате лечения рака почек, у 40-50% больных появляются метастазы в течение первого года лечения. Чаще всего метастазы обнаруживают в легких и костях[8].

Почти все раковые заболевания почек связаны с иммунной дисфункцией. Рациональная разработка новых методов лечения противоопухолевой

активности иммунной системы тесно связана с пониманием сложных взаимодействий между иммунной системой и опухолью.

Иммунная система организма играет ключевую роль в механизмах противоопухолевой защиты. Но стоит отметить, что все-таки главную функцию в этом процессе выполняет клеточный иммунитет[9].

Доказано, что дисфункциональная миграция нейтрофилов, а также перекрестные помехи Т-лимфоцитов, созревание дендритных клеток, метаболизм иммунных клеток, реактивность и аномальная экспрессия цитокинов и хемокинов и их рецепторов были выделены в клетках почечно-клеточного рака и стромы. Клетки почечно-клеточного рака богаты иммунными инфильтратами, состоящими из Т-клеток, НК-киллеров, дендритных клеток, макрофагов, нейтрофилов и других. Различные функции приписываются различным подмножествам лейкоцитов.

Нейтрофилы, являются важными компонентами микроокружения рака почки. Цитопатический эффект нейтрофилов осуществляется посредством продукции АФК в результате «респираторного взрыва». Различные подтипы Т-лимфоцитов также рекрутируются в микроокружение опухоли и взаимодействуют с опухолевыми клетками, что может вызывать гибель опухолевых клеток, становясь анергическим или даже подавлять иммунный ответ против опухоли. Цитотоксические Т-клетки, играют важную роль в адаптивном иммунитете в ответ на опухоль[10].

Роль иммунной системы в почечно-клеточном раке наблюдается не только на клеточном уровне, но и через медиаторы воспаления, то есть через действие цитокинов и хемокинов, которые действуют на клетки опухоли и стромы. Микроокружение опухоли представляет собой сложную структуру, состоящую из нескольких медиаторов, которые участвуют в передаче сигналов клетки. Профиль активации внеклеточного матрикса, фибробластов, иммунных клеток, кровеносных сосудов и эндотелиальных клеток имеет важное значение для патогенеза рака. Резидентные неопухолевые клетки или инфильтрованные

клетки в местах опухоли могут даже подавлять развитие рака почки. Тем не менее, опухолевые клетки могут избежать иммунного ответа, координируя изменения в этих клетках и стимулируя секрецию иммуносупрессивных факторов для онкогенеза, провоспалительных цитокинов и включая ангиогенные факторы[11].

В человеческом организме опухолевые клетки появляются постоянно. Наша иммунная система строго следит за этими процессами, чтобы вирусы, бактерии и раковые клетки не уничтожили организм. Хуже иммунная система справляется с перерожденными клетками. На начальных этапах она их замечает и уничтожает или блокирует. Но в какой-то момент рост опухоли становится неконтролируемым, а иммунитет перестает замечать и уничтожать раковые клетки[12].

Роль иммунной системы в раке почки становится все более ясной, в то время как новые выводы, полученные в результате клинических испытаний и выявления дополнительных прогностических биомаркеров, расширяют наше понимание микроокружения опухоли. Иммунная система играет ключевую роль при раке почки, и это следует учитывать как для понимания заболевания, так и для разработки новых методов лечения[8].

1.2 Опухолевые заболевания, их причины и особенности опухолевых клеток

Канцерогенез — это сложный многостадийный процесс, в результате которого происходит накопление изменений в геноме клеток. Индуктором развития канцерогенеза являются различные по своей природе канцерогенные факторы.

На некоторых стадиях канцерогенез обладает обратимостью, но при неблагоприятных условиях для организма приводит к развитию злокачественной опухоли. Основными и самыми главными отличительными признаками опухоли являются наличие морфологического, метаболического и

функционального атипизма клеток опухоли. Кроме того, в опухолевых клетках наблюдаются неконтролируемый рост, ослабление адгезивности, нарушение структуры и функций мембран, анаплазия и метастазирование[13].

Примечательно, что постоянный окислительный стресс и хроническое воспаление поддерживают друг друга, приводя к новообразованию и способствуя прогрессированию опухоли. Воспаление связано с развитием рака, и было показано, что медиаторы воспаления, такие как цитокины и хемокины стимулируют пролиферацию как нетрансформированных, так и опухолевых клеток.

Опухолевые заболевания – это вид патологии, при котором клетки имеют свойство безудержно расти и неконтролируемо размножаться в очаге заболевания. Рост опухоли берет начало из зачатка опухолевых клеток, без вовлечения в процесс окружающих неизмененных клеток. Однако злокачественные клетки обладают особенностью передавать свои свойства всем последующим поколениям клеток. Опухоли человека в значительной степени неоднородны. Эта неоднородность является результатом того, что начальная мутация запускает дополнительные мутации, в том числе мутации в генах, которые поддерживают генетическую стабильность, запуская каскад мутаций по всему геному[6].

Метастазирование включает распространение раковых клеток из первичной опухоли в окружающие ткани и в отдаленные органы и является основной причиной заболеваемости и смертности от рака. Способность к метастазированию является отличительной особенностью злокачественных опухолей. Чтобы завершить метастатический каскад, раковые клетки должны отделиться от первичной опухоли, проникнуть в кровеносную и лимфатическую системы, избежать иммунной атаки, а также проникнуть и размножиться в отдаленных органах. Метастатические клетки также создают микроокружение, которое способствует ангиогенезу и пролиферации, что приводит к макроскопическим, злокачественным вторичным опухолям[14].

Ученые предположили, что сложность рака можно суммировать в шести отличительных признаках, которые позволяют нормальным клеткам превращаться в онкогенные, а потом и в злокачественные. Эти отличительные признаки следующие: (1) способность опухолевых клеток к неконтролируемому росту; (2) нечувствительность к сигналам остановки роста; (3) уклонение от апоптоза, то есть они противостоят своей запрограммированной смерти; (4) неограниченный репликативный потенциал, то есть опухолевые клетки могут размножаться бесконечно; (5) устойчивый ангиогенез, то есть они стимулируют рост кровеносных сосудов; (6) проникать в ткани и метастазировать, то есть опухолевые клетки проникают в окружающие ткани и распространяются в отдаленные места. Однако следует отметить, что отличительные признаки 1–5 также являются характеристиками доброкачественных опухолей. Также, существует еще четыре дополнительных признака: (1) аномальные метаболические пути, (2) уклонение от иммунной системы, (3) нестабильность генома и (4) воспаление.

Детальное понимание многостадийного канцерогенеза важно как для лечения, так и для профилактики рака. Поэтому крайне необходимо продолжать дальнейшие исследования механизма канцерогенеза с целью профилактики, лечения, а также разработки новых стратегий борьбы с этим смертельным заболеванием[15].

Наиболее распространенными причинами опухолевых заболеваний является влияние различных опухолеродных факторов. Например, факторы внешней среды, химические и лучевые канцерогенные агенты, изменения внутренней среды организма, нарушения гормонального баланса, и опухолевые вирусы[7].

1.3 Роль нейтрофилов в онкологических заболеваниях

Нейтрофилы - это фагоцитарные лейкоциты, которые необходимы для эффективного врожденного иммунитета. Нейтрофилы являются наиболее распространенными лейкоцитами в крови и считаются первой линией защиты при воспалении и инфекциях. Нейтрофилы образуются в костном мозге, высвобождаются в кровообращение, где они живут около суток, и мигрируют к месту их действия вдоль химического градиента хемокинов, выделяемых инфекционными агентами или другими воспалительными клетками. Они содержат многослойное ядро, мало митохондрий и цитоплазматические гранулы, содержащие многочисленные протеолитические и гидролитические ферменты. Различные антимикробные и цитотоксические соединения, содержащиеся в гранулах, могут разрушать злокачественные клетки. Стимулированные нейтрофилы являются наиболее интенсивными физиологическими продуцентами супероксидных радикалов благодаря активации НАДФН-оксидазного комплекса. НАДФН-оксидаза, катализирует респираторный взрыв, в результате которого образуются АФК[16].

В норме нейтрофилы находятся в состоянии покоя, а при стимуляции проявляют цитотоксическую активность, посредством содержащихся в гранулах АФК и протеолитических ферментов. Являясь первой линией защиты и основными эффекторными клетками, нейтрофилы активно синтезируют АФК при воспалительных процессах. Продуцируемые АФК имеют канцерогенный потенциал, посредством которого происходит увеличение количества мутаций в клетках[17].

При лабораторных исследованиях нейтрофилов все чаще подтверждается гипотеза о том, что наличие нейтрофилов в опухолях коррелирует с плохим прогнозом. Это было доказано с помощью клинических наблюдений для многих видов рака, в том числе и для почечной карциномы[2].

У многих пациентов на поздних стадиях рака обнаруживается повышенное количество нейтрофилов в крови. Как именно опухоли вызывают нейтрофилию, на данный момент неизвестно, но производство гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) является возможным механизмом при некоторых типах рака. Кроме того, другие цитокины, такие как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), интерлейкин-1 (IL-1) и IL-6, продуцируемые опухолями, по-видимому, способствуют повышению числа нейтрофилов в крови. Эта нейтрофилия связана с плохим прогнозом раковых заболеваний. Поскольку нейтрофилия часто ассоциируется с воспалительными реакциями на инфекции и повреждение тканей, то нейтрофилия является доказательством концепции прогрессирования опухоли, индуцирующего воспаление, связанное с раком[18].

На ранних стадиях рака нейтрофилы человека выполняют в первую очередь противоопухолевые функции, стимулируя ответы Т-клеток и высвобождая провоспалительные факторы, такие как IL-8, TNF- α и IL-6, которые усиливают опухолевый ответ[19].

Несмотря на то, что нейтрофилы являются жизненно важным компонентом иммунной защиты, однако при раке они могут способствовать прогрессированию опухоли, отчасти путем генерирования активных форм кислорода (АФК), которые нарушают функции лимфоцитов. Нейтрофилы способствуют прогрессированию опухоли, усиливая инвазию и метастазирование посредством высвобождения протеаз, усиления ангиогенеза и прямой стимуляции роста опухоли. Кроме того, было доказано, что нейтрофилы ограничивают противоопухолевые иммунные ответы путем подавления активности Т-клеток и НК-клеток посредством различных факторов, таких как аргиназа и реактивные свободные радикалы[20].

Доказано, что под влиянием цитокинов, нейтрофилы приобретают свойства антиген-презентирующих клеток (АПК). Основная их роль заключается в представлении переработанных антигенов Т-лимфоцитам и

способности регулировать функции НК-клеток. Нейтрофилы, обладающие свойством антиген-презентирующих клеток, выполняют важные функции, в первую очередь влияние на дифференцировку, пролиферацию, а также активацию Т-лимфоцитов[21].

Функциональная активность нейтрофилов напрямую зависит от интенсивности респираторного взрыва, а также от состояния внутриклеточных метаболических процессов. Нейтрофилы образуют первый барьер на пути проникновения в организм различных патогенных агентов[22].

Инвазивные микроорганизмы вызывают воспалительный ответ, который рекрутирует нейтрофилы из кровотока в ткани. Там нейтрофилы разрушают микроорганизм с помощью ряда механизмов, в основном фагоцитоза, выделения антимикробных веществ и образования внеклеточных ловушек. Активированные нейтрофилы также выделяют протеиназы в окружающую ткань, тем самым вызывая повреждение тканей и клеток хозяина. Кроме того, нейтрофилы способны продуцировать многие цитокины и хемокины, которые имеют способность влиять как на воспалительный, так и на иммунный ответ[3].

1.3.1 Взаимосвязь функциональной активности и метаболизма нейтрофильных гранулоцитов

При исследовании нейтрофилов крови людей больных онкологическими заболеваниями, наблюдается высокий уровень поглотительной и метаболической активности данной группы фагоцитарных клеток. Показатели уровней поглотительной и метаболической активности обеспечивают выполнение основной функции нейтрофилов, а именно реализацию фагоцитоза[23].

Нейтрофильные гранулоциты мигрируют в очаг воспаления очень быстро, ведь они способны осуществлять защиту иммунной системы на ранних стадиях развития воспаления или опухоли. Кроме того, нейтрофилы при

активации и миграции к месту воспаления, очень быстро осуществляют респираторный взрыв[24].

При фагоцитозе нейтрофильных гранулоцитов увеличивается потребление кислорода, в результате чего развивается респираторный взрыв. Этот процесс характеризуется синтезом АФК и определяет функциональную активность нейтрофилов. Именно от фагоцитарной активности нейтрофилов зависит эффективность иммунной защиты организма[25].

Метаболически нейтрофилы часто считаются чисто гликолитическими. При ограниченном поступлении глюкозы окислительные нейтрофилы используют митохондриальное окисление жирных кислот для поддержки продукции АФК, зависимой от НАДФН-оксидазы. Соответственно, вызванные опухолью нейтрофилы способны поддерживать выработку АФК и подавление Т-клеток, когда использование глюкозы ограничено. В соответствии с этими данными, нейтрофилы периферической крови пациентов с онкологическими заболеваниями также демонстрируют повышенную незрелость, содержание митохондрий и окислительное фосфорилирование. Следовательно, микроокружение опухоли с ограниченной глюкозой индуцирует метаболически адаптированные окислительные нейтрофилы для поддержания локальной иммунной супрессии[26].

Метаболизм нейтрофильных гранулоцитов обеспечивает их функциональную реактивность и влияет на развитие и исход воспалительных процессов. Исследование метаболических механизмов и реализации функциональной активности фагоцитов позволит охарактеризовать физиологические механизмы жизнедеятельности клеток, и патогенетические процессы воспалительных заболеваний. С помощью динамики функционально-метаболической активности нейтрофилов можно оценить эффективность проводимой терапии[27].

1.4 Респираторный взрыв

Респираторный взрыв — это состояние фагоцитирующих клеток, а именно нейтрофилов, которое наступает после рецепции и захвата ими чужеродного материала. Этот процесс характеризуется резким повышением метаболической активности нейтрофилов. Кроме того, при респираторном взрыве наблюдается усиление потребления кислорода и повышенная утилизация глюкозы. В результате респираторного взрыва повышается синтез АФК, который инициируется активацией НАДФН-оксидазы. Фермент НАДФН-оксидаза, ответственный за респираторный взрыв, переносит электроны от цитозольного НАДФН через плазматическую мембрану или мембрану фагоцитарной вакуоли, к кислороду. Таким образом, O_2^- и его вторичные продукты накапливаются либо во внеклеточном пространстве, либо в пределах фагоцитарной вакуоли, оказывая токсическое воздействие на внеклеточных микробов (или смежных клеток - хозяев) или поглощенных организмов, соответственно.

АФК обладают противомикробным действием, но избыточная продукция АФК является повреждающим фактором для клеток организма человека. Поэтому дыхательный взрыв должен находиться под контролем клеточных сигнальных систем, так как для нормального функционирования организма необходимо поддерживать оптимальный уровень синтеза АФК нейтрофилами. Все АФК делятся на несколько основных групп — это первичные АФК и вторичные. Интенсивность респираторного взрыва характеризуется с помощью определения уровня синтеза АФК[19].

Состояние респираторного взрыва, как правило, изучают с помощью двух хемилюминесцентных индикаторов: люцигенина и люминола. Люминол является хорошим показателем функционального состояния фагоцитов крови, а люцигенин используют для изучения синтеза супероксидных радикалов различными клетками[6].

1.4.1 Роль респираторного взрыва при опухолевом процессе

С одной стороны, респираторный взрыв является важным компонентом врожденного иммунитета, позволяющим фагоцитирующим клеткам устранять микробные и патогенные частицы. Однако, с другой стороны, чрезмерное производство АФК может привести к индукции окислительного стресса в клетках.

При инфекционно-воспалительных и онкологических заболеваниях наблюдаются изменения синтеза АФК фагоцитами. Большой интерес ученых вызывает исследование роли различных типов фагоцитирующих клеток в онкогенезе.

Таким образом, оценка респираторного взрыва нейтрофилов, позволяет оценить функциональную активность нейтрофилов и изучить способности клеток врожденного иммунитета реагировать на патогенные и воспалительные агенты. У здоровых людей процесс респираторного взрыва строго регулируется и контролируется ИС, так как неправильное или чрезмерное высвобождение АФК нейтрофилами может привести к повреждению окружающей ткани и считается ключевым фактором в развитии патологий. Механизм образования АФК при респираторном взрыве нейтрофилов, является одним из ключевых механизмов врожденной иммунной системы. Целью оценки интенсивности респираторного взрыва является возможность применять эти данные при выборе методов лечения, прогнозировании, развития и исхода заболевания, так как интенсивность респираторного взрыва может изменяться в течение заболевания[28].

1.4.2 Активные формы кислорода и их роль в онкологических заболеваниях

Активные формы кислорода (АФК) давно считаются просто вредными побочными продуктами метаболизма, которые повреждают клеточные белки, липиды и нуклеиновые кислоты. АФК также известны как оружие фагоцитов, используемых против патогенов, вторгающихся в организм хозяина. Однако за последнее десятилетие появилось понимание, что АФК также играют важную роль в качестве сигнальных мессенджеров на множестве путей во всех клетках, тканях и органах. Вклад свободных радикалов многогранен в канцерогенезе и злокачественном прогрессировании опухолевых клеток, что можно рассматривать как уникальную характеристику рака [29].

АФК - это небольшие короткоживущие кислородсодержащие молекулы, обладающие высокой химической активностью. Это свойство АФК в основном обусловлено их неспаренными электронами (радикалами). *Супероксид-радикал* ($O_2^{\cdot-}$), *перекись водорода* (H_2O_2), *гидроксильный радикал* ($OH^{\cdot-}$), *хлорноватистая кислота* ($HOCl$), *перекиси липидов* ($ROOH$), *синглетный кислород* (1O_2) и *озон* (O_3) – одни из наиболее распространенных АФК.

Супероксид и перекись водорода являются наиболее важными АФК, участвующими в регуляции биологических процессов.

$O_2^{\cdot-}$ это обычно тот вид, из которого происходят другие АФК. Однажды произведенный $O_2^{\cdot-}$, либо быстро реагирует с окружающими молекулами, либо самопроизвольно превращается в перекись водорода.

H_2O_2 более стабилен, менее реактивен, может диффундировать в микроокружение и даже пересекать клеточные мембраны. H_2O_2 может реагировать с определенными аминокислотами, обычно с цистеинами и метионинами, или может превращаться в $OH^{\cdot-}$, $HOCl$ (миелопероксидазой) или H_2O (с помощью *каталазы*, *пероксидазы*, или *пероксиредоксина*).

Как OH^\cdot , так и НОС^\cdot обладают высокой реактивностью и обычно необратимо повреждают близлежащие молекулы.

Фагоцитарные клетки продуцируют АФК для уничтожения попавших в организм бактерий во время *респираторного взрыва*. В этих клетках АФК продуцируются ферментом *НАДФН-оксидазой*[30].

Многие исследования определили АФК как усиливающий опухоль или подавляющий опухоль агент, с многочисленными доказательствами, подтверждающими оба аргумента.

Нормальные соматические клетки требуют АФК для ряда клеточных процессов, таких как механизмы иммунной защиты и обязывают вторичную передачу сигналов. В раковых клетках уровни АФК повышаются благодаря как внешним, так и внутренним механизмам. Общий баланс АФК и совокупные положительные и вредные эффекты АФК способствуют окончательному воздействию на биологию рака.

АФК играет противоречивую роль в биологии рака. Повышенные уровни АФК способствуют онкогенезу, прогрессированию и распространению рака через стимулирование и поддержание передачи сигналов онкогенных клеток, что приводит к пролиферации опухолевых клеток, выживанию, аутофагии и метастазированию[2].

Доказано, что токсины окружающей среды, связанные с раком, увеличивают количество видов АФК, например курение и УФ-излучение. Кроме того, поскольку АФК являются неизбежным побочным продуктом метаболизма, повышенный метаболизм, поддерживающий повышенную пролиферацию в раковых клетках, приводит к увеличению продукции АФК. АФК образуются в результате активации ряда известных онкогенов, например, *Стус*, *Kras* и *BRCA1*. Также, АФК увеличиваются из-за гипоксии, вызванной опухолями, когда сосудистая сеть больше не может адекватно снабжать растущее повреждение. Наконец, изменения в передаче сигналов, связанные с онкогенной трансформацией, такие как измененная

активация интегрина во время метастазирования рака, также связаны с увеличением продукции видов АФК. Все эти объединенные механизмы приводят к значительному повышению уровней АФК раковых клеток, вокруг которых остается много споров относительно влияния АФК на опухоль.

Четкий механизм, посредством которого АФК влияют на развитие опухоли, заключается в прямом повреждении ДНК во время канцерогенной трансформации[31].

В зависимости от стадии прогрессирования рака, внутриклеточная АФК играет различную роль в выживании раковых клеток. На предраковых и ранних стадиях рака внутриклеточные АФК способствуют инициации рака путем индукции мутаций окислительной и замещающей пар оснований в проонкогенах, таких как Ras, и генах-супрессорах опухолей, таких как p53. Помимо индукции мутаций, АФК также могут модифицировать сайт-специфические боковые цепи аминокислот, которые изменяют структуру и функции белка. Среди аминокислот цистеин (Cys) более склонен к окислению под действием АФК из-за присутствия тиольной группы.

По мере прогрессирования рака накопление избыточных внутриклеточных АФК может вызывать апоптоз, но опухолевые клетки избегают апоптоза, продуцируя высокие уровни внутриклеточных антиоксидантов.

На поздних стадиях развития рака метастатические опухоли используют АФК в качестве участка для распространения раковых клеток. В результате, играет ли АФК противоопухолевую или онкогенную роль, может зависеть от различных стадий развития и прогрессирования рака[32].

1.4.3 Синтез АФК в процессе респираторного взрыва фагоцитирующих клеток

Нейтрофилы способны генерировать почти весь спектр радикальных и нерадикальных окислителей, которые имеют отношение к окислительно-восстановительной биологии. Их называют АФК. Наиболее важными окислителями, производимыми нейтрофилами, кроме супероксида и перекиси водорода, являются те, которые вырабатываются МРО (миелопероксидазой). МРО использует перекись водорода для окисления широкого спектра субстратов до реакционноспособных продуктов. К ним относятся нерадикальные окислители, основные из них - хлорноватистая и гипотиоциановая кислоты, а также радикалы, образующиеся из органических и неорганических субстратов[33].

Стимулированные нейтрофилы являются наиболее интенсивными физиологическими продуцентами супероксидных радикалов благодаря активации НАДФН-оксидазного комплекса. Сборка этого комплекса начинается на цитоплазматической мембране в ответ на фагоцитоз, иммунные стимулы или бактериальные компоненты[6].

НАДФН-оксидаза функционирует, генерируя АФК, которые в свою очередь уничтожают микробы и патогенные агенты, и играют роль в патогенезе рака, повреждая нормальные ткани.

НАДФН-оксидаза – это оксидаза респираторного взрыва, которая генерирует большое количество супероксид-аниона ($O_2^{\cdot-}$). Активированная НАДФН-оксидаза катализирует перенос электронов от НАДФН на молекулярный кислород, генерирующий супероксидные анионы в качестве основного продукта. Чтобы минимизировать повреждение, клетки снабжены антиоксидантными ферментами, такими как супероксиддисмутаза (СОД). СОД и глутатионпероксидаза могут превращать супероксид-анион и перекись водорода в воду, что ограничивает повреждения клеток. С другой стороны,

супероксид-радикалы могут быть преобразованы в другие активные формы кислорода, которые могут повредить клетки хозяина.

В организме человека существует несколько типов НАДФН-оксидазы. Различие этих типов наблюдается в составе субъединиц, регуляции и клеточной специфичности. Основными компонентами НАДФН-оксидазы являются две субъединицы: p91phox и p22phox. Субъединица p91phox содержит участок связывания НАДФН- и FAD-связывающие сайты в цитозольном С-концевом хвосте и шесть трансмембранных спиралей с лигандами для двух гемов, по одному возле каждой поверхности мембраны[34].

Субъединица p91phox – это трансфераза НАДФН-оксидазы. Ее цитозольный домен принимает электроны от НАДФН и передает их через мембрану на кислород. А субъединица p22phox действует как станция для регуляторного тримерного комплекса посредством его взаимодействия с p47phox. В процессе сборки и активации НАДФН-оксидазы к мембранным субъединицам присоединяются регуляторные субъединицы (p47phox, p67phox, p40phox) и малый G-белок Rac1. Регуляторный комплекс, состоящий из p40phox, p47phox и p67phox, находится в виде комплекса в цитозоле неактивных клеток. Разделение компонентов оксидазного комплекса на две группы и их распределение между различными субклеточными компартментами клетки предотвращает самопроизвольную активацию и потенциальное повреждение в покоящейся клетке. Процесс сборки НАДФН-оксидазного комплекса начинается с фосфорилированного белка p47phox[35].

После того, как завершился процесс сборки ферментативного НАДФН-оксидазного комплекса, субъединица gp91phox, приобретает определенную конформацию, способную осуществлять передачу электрона от НАДФН, на молекулу кислорода O₂, образуя короткоживущий супероксид-радикал (O₂^{•-}). Супероксидный-радикал важен в качестве основного продукта для генерации АФК. Далее супероксид-радикал быстро превращается в перекись водорода самопроизвольно или с помощью СОД. Перекись водорода обладает

выраженной антимикробной активностью и не является по существу реакционноспособным соединением, но может быть превращена в высокореактивные и вредные продукты. Например, при участии МРО происходит образование хлорноватистой (гипохлорной) кислоты (HOCl) из перекиси водорода и ионов хлора. Этот продукт реакции обладает высоким антимикробным эффектом[36].

Также, возможно образование наиболее активной формы кислорода – гидроксильного радикала. Является наиболее токсичным метаболитом кислорода. Объясняется это тем, что гидроксильный радикал, воздействуя на клетки, оказывает разрушительное влияние, например, разрыв пептидных связей внутри белковых молекул и повреждение нитей ДНК. Гидроксильный радикал может образовываться в результате нескольких реакций. Во-первых, при взаимодействии хлорноватистой кислоты с супероксид-радикалом, а во-вторых, при спонтанной дисмутации, в присутствии ионов железа[16].

1.5 Метод хемилюминесценции

Хемилюминесценция (ХЛ) – это явление, при котором химическая реакция сопровождается выделением кванта света, т.е. свечением. В таких реакциях происходит переход возбужденных молекул в основное состояние, сопровождающийся испусканием кванта света, квантовый выход которого достаточно высок[25].

В протекании хемилюминесцентной реакции выделяют определенное количество этапов. Выделение фотона света из молекулы, является довольно сложным и многостадийным процессом:

- 1) На первом этапе происходит восстановление одного из участников реакции. Это осуществляется путем присоединения электрона и окисления второго участника реакции, путем отрыва электрона. В системе происходит запасание химической энергии.
- 2) На второй стадии осуществляется перенос электрона (ОВР) на один из более высоких энергетических уровней. В результате этой реакции образуется промежуточный продукт в электронно-возбужденном состоянии.
- 3) На последней стадии продукт, находящийся в электронно-возбужденном состоянии переходит в основное состояние, тем самым испуская квант света.

Метод клеточной хемилюминесценции применяется в основном для оценки функционального состояния фагоцитирующих клеток крови (нейтрофилов, моноцитов и др.) и заключаются в том, что специфическим ответом этих клеток на стимул или раздражитель является увеличение продукции свободных радикалов и АФК – кислородный взрыв.

При проведении хемилюминесцентного анализа используют химические активаторы, которые вступают в реакцию с АФК или свободными радикалами. В результате этой химической реакции, происходит образование продукта в электронно-возбужденном состоянии, при переходе которого в основное состояние наблюдается испускание кванта света.

Наиболее известные хемилюминесцентные активаторы, которые используют для оценки респираторного взрыва это люминол и люцигенин. Важно отметить то, что люминол взаимодействует и с первичными, и с вторичными АФК. Следовательно, используя люминол в реакционной смеси, становится невозможно определить уровень синтеза конкретного типа АФК. Однако использование люминола, позволяет интегрально оценить состояние респираторного взрыва нейтрофилов, их функциональное состояние и способность выполнять защитную функцию. Эта способность усиливается, как правило, при возникновении в организме очагов воспаления, что наблюдается после инфаркта миокарда или при раке[37].

Несмотря на то, что хемилюминесценция люминола является очень чувствительным методом обнаружения радикалов кислорода, он все-таки считается не специфичным.

Что касается люцигенина, он отличается большей избирательностью. Его свечение наблюдается при восстановлении красителя супероксидными радикалами. Именно люцигенин зачастую используют для изучения образования супероксидных радикалов различными клетками. Кроме того, с помощью люцигенина возможно исследовать биохимические реакции в пробирке и уровни синтеза первичных АФК[38].

Исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов позволяет оценить состояние активности НАДФН-оксидазы и уровень выделения супероксид-радикала для реализации механизма внешнего киллинга у больных.

Измерение люминол-зависимой ХЛ клеток крови широко используется для изучения функционального состояния фагоцитарного звена иммунитета[24].

2 Материалы и методы

2.1 Материалы исследования

Исследуемым материалом была периферическая кровь людей, больных раком почки и относительно здоровых людей. Выделение нейтрофилов осуществляется следующим образом:

1)Использовали фиколл-урографин $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ и $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$, создавая двойной градиент. Сначала в пробирку вносили фиколл-урографин с плотностью $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$ – для выделения популяции нейтрофилов, а затем с плотностью $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ - для выделения популяции лимфоцитов.

2)Гепаринизированную периферическую кровь наслаивали на двойной градиент фиколл-урографина. После этого центрифугировали 40 минут при 1500 оборотов.

3) После центрифугирования получали разделение клеток в виде колец. Верхнее кольцо – лимфоциты, нижнее кольцо - нейтрофилы, а в осадке находились эритроциты.

4)Нейтрофильный слой аккуратно собирали и переносили в стерильные центрифужные пробирки, заполненные стерильным раствором Хэнкса. После этого, трижды центрифугировали при 1500 оборотов в течение 10 минут.

5) После удаления супернатанта осадок нейтрофилов ресуспендировали в 1 мл раствора Хэнкса. Далее подсчитывали количество нейтрофилов в камере Горяева.

2.2 Определение хемилюминесцентной активности нейтрофилов

Перед проведением исследования, производится подготовка реакционных смесей, которые после этого переносят в прибор. Анализ проводили со следующими компонентами в общем реакционном объеме: 510-550мкл. Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состоит из: 20 мкл донорской сыворотки крови; 50 мкл хемилюминесцентного индикатора (люминола/люцигенина) в концентрации $10^{-5}M$; 40 мкл суспензии опсонизированных частиц зимозана – для определения индуцированной хемилюминесценции; 200 мкл взвеси нейтрофилов; 240 мкл раствора Хэнкса для определения спонтанной хемилюминесценции; 200 мкл раствора Хэнкса – для индуцированной хемилюминесценции. Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции проводили с помощью 36-канального биохемилюминесцентного анализатора “БХЛМ 3606м” в течение 90 минут.

При проведении хемилюминесцентного анализа, определяют такие показатели, как T_{max} – время выхода на максимум, I_{max} - максимальное значение интенсивности, S - площадь под кривой и индекс активации ХЛ. ИА определяется отношением площади кривой хемилюминесценции индуцированной зимозаном к спонтанной хемилюминесценции.

2.3 Статистические методы исследования

После проведения хемилюминесцентного анализа и получения результатов, в программе MSExcel 2010 была сформирована база данных. На основе этой базы данных, с помощью программы Statistica 8,0, осуществляли статистический анализ. Описание выборки статистических данных производились путем подсчета медианы и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому U-критерию Манна–Уитни. Различия принимали за статистически значимые при $p < 0,05$.

3 Результаты и обсуждение

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейтрофилы образуют первый барьер на пути проникновения в организм различных патогенных агентов. При воспалительной реакции или опухолевом процессе, нейтрофилы с помощью молекул адгезии прилипают к эндотелию, мигрируют в ткани, после чего фагоцитируют трансформированные клетки.

Окислительный стресс способствует старению, разрушению и многим заболеваниям, таким как диабет, ожирение, в том числе и рак. Окислительный стресс возникает, когда в клетке накапливается избыточное количество АФК из-за дисбаланса окислительной и восстановительной активности, что приводит к повреждению клетки[2].

АФК играют критическую роль в опухолевой патологии. Высокий уровень внутриклеточных АФК из-за дефектов производства АФК или процессов детоксикации может превратить нормальную клетку в злокачественную клетку. Повышенные уровни АФК, изменение окислительно-восстановительного баланса и нерегулируемая окислительно-восстановительная передача сигналов являются общими признаками прогрессирования рака и устойчивости к лечению.

Нейтрофильные гранулоциты в случае опухолевых заболеваний имеют особенность, отличающую поведение нейтрофилов при любом другом воспалении. А именно, когда факторы мобилизации нейтрофилов секретируются эндотелиальными клетками и другими стромальными клетками, в контексте рака, факторы мобилизации нейтрофилов часто секретируются самими опухолевыми клетками. Наиболее распространенные нейтрофильные хемоаттрактанты, продуцируемые опухолями, включают IL-8, MIP-1 α (CCL3), huGCP-2 (CXCL6) и др.

Результаты проведенного исследования выявили изменения показателей ХЛ нейтрофилов периферической крови у людей больных раком почек в сравнении с показателями контрольной группы.

С помощью ХЛ анализа доказано, что у больных раком почки наблюдается повышенный уровень респираторного взрыва нейтрофилов крови, что характеризует их функциональную активность. Достоверно выявлено, что у людей больных раком почки стабильно увеличивается максимум интенсивности– при спонтанной люминол-зависимой ХЛ и при зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой ХЛ в сравнении с контрольными показателями. Это обусловлено тем, что происходит повышение уровня синтеза первичных и вторичных АФК нейтрофилами у больных.

У людей, страдающих раком почки, происходит увеличение активности НАДФН-оксидазы и повышается синтез АФК, так как выявлено увеличение площади под кривой люцигенин-зависимой зимозан-индуцированной ХЛ. При люцигенин-зависимой ХЛ только активированные зимозаном нейтрофилы в группе больных раком почки начинают интенсивно вырабатывать АФК, что является причиной их высокой суммарной продукции.

ХЛ анализ функциональной активности нейтрофилов у больных раком почки, не выявил достоверно значимого изменения таких показателей, как время выхода на максимум и величина индекса активации спонтанной и индуцированной ХЛ в группе больных относительно контроля. Индекс активации не проявился, так как статистический анализ показал широкий разброс показателей.

Таким образом, ХЛ анализ это высокочувствительный метод, на основе которого, возможно оценить влияние различных регуляторных факторов и патогенов, а также развития опухолевого процесса на функцию фагоцитов. Результаты, полученные с помощью хемилюминесцентного анализа, можно использовать при оценке эффективности проводимой терапии, в качестве дополнительных клинико-диагностических тестов рассматриваемой патологии, а также при прогнозировании развития и исхода различных иммунопатологических состояний.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК - активные формы кислорода

АПК - антиген-презентирующие клетки

ИА - Индекс активации

ИС - иммунная система

МРО - миелопероксидаза

СОД - супероксиддисмутаза

НГ - нейтрофильные гранулоциты

I_{max} - максимальное значение интенсивности

S - площадь под кривой хемилюминесценции

ХЛ - хемилюминесценция

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев, Н.Н. Иммунорегуляторные клетки как потенциальные биомаркеры рака / Н.Н. Беляев, Ю.В. Перфильева, Е.О. Остапчук, В.А. Абрамова // Вестник Казахского Национального Медицинского Университета. - 2016.-№ 3.- С. 185-191.
2. Liao, Z. Reactive oxygen species: a volatile driver of field cancerization and metastasis / Z. Liao, D. Chua, N. Soon Tan // Molecular Cancer.-2019.-Vol.18, T.65.-P.139-151.
3. Uribe-Quero, E. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin / E. Uribe-Querol, C. Rosales // J. Immunology Research.-2015.-P. 21-37.
4. Ocana, A. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies / A. Ocana, C. Nieto-Jiménez, A. Pandiella, A. J. Templeton // Molecular Cancer.-2017.-Vol.16.-P.137-149.
5. Dahlgren, C. Respiratory burst in human neutrophils /C. Dahlgren, A. Karlsson// Journal of Immunological Methods.- 1999.- Vol. 232.- P. 3-14.
6. Hu, K. Prognostic role of the neutrophil–lymphocyte ratio in renal cell carcinoma: a meta-analysis / K. Hu, L. Lou, J. Ye, S. Zhang // BMJ Open.- 2015.- Vol. 5.-P.148-159.
7. Кушлинский, Н.Е. Современные подходы к иммунотерапии рака почки / Н.Е. Кушлинский, М.В. Фридман, А.А. Морозов, Е.С. Герштейн, З.Г. Кадагидзе, В.Б. Матвеев // Окноурология.-2018.-Т.14, №2.-С. 54-67.
8. Савченко, А.А. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечно-клеточным раком / Медицинская иммунология.- 2015.- Т. 17, № 2.-С. 141-150.
9. Куртасова, Л.М. Особенности иммунного ответа у больных с разными гистологическими типами почечно-клеточного рака / Л.М. Куртасова, Е.А. Шкапова, Р.А. Зуков // Медицинская иммунология. - 2013. - Т. 15, № 4.- С. 375-382.

10. Shaul, M. E. Neutrophils as Active Regulators of the Immune System in the Tumor Microenvironment / M. E. Shaul, Z. G. Fridlender // *Journal of Leukocyte Biology*.- 2017.-Vol.102, №2.-P.343-349.
11. Chudzinski-Tavassi, A. M. Role of Immune System in Kidney Cancer / A. M. Chudzinski-Tavassi, K. L. Pereira Morais, J. G. Souza, R. Chammas // *Evolving Trends in Kidney Cancer*.-2018.-P.291-303.
12. Лактионов, К.К. Современный взгляд на механизмы регуляции противоопухолевого иммунитета / К.К. Лактионов, В.В. Бредер, Л.В. Лактионова // *Вестник ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»* /- 2017.- Т. 28, №3–4.- С. 3-9.
13. Whiteman, D. C. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review / D. C. Whiteman, Wilsona L. F. // *Cancer Epidemiology*.- 2016.-Vol.44.-P.203-221.
14. Seyfried, T. N. On the Origin of Cancer Metastasis / T. N. Seyfried, L. C. Huysentruyt // *Crit. Rev. Oncog*.-2013.Vol. 18, №2.-P. 43–73.
15. Basu, A. K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer / A. K. Basu// *International J. Molecular Sciences*.-2018.-Vol.19, №4.-P. 970-985.
16. Winterbourn, C. C. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function/ C. Winterbourn, A. J. Kettle, and M. B. Hampton // *Annual Review of Biochemistry*.- 2016. -Vol. 85.-P. 765-792.
17. Данилова, А.Б. Вопросы онкологии / А.Б. Данилова, И.А. Балдуева // *Нейтрофилы как компонент опухолевого микроокружения/ Воронеж. гос. ун-т*. –2016. – Т. 62, № 1. С. 35-44.
18. Swierczak, A. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis / A. Swierczak, K. A. Mouchemore, J. A. Hamilton, R. L. Anderson // *Cancer and Metastasis Reviews*.- 2015.-Vol. 34.-P. 735–751.
19. Лактионов, К.К. Современный взгляд на механизмы регуляции противоопухолевого иммунитета/ К.К. Лактионов, В.В. Бредер, Л.В. Лактионова // *Вестник ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»*.- 2017.- Т. 28, №3–4.- С. 3-9.

20. Rice, C. M. Tumour-elicited neutrophils engage mitochondrial metabolism to circumvent nutrient limitations and maintain immune suppression / C. M. Rice, L. C. Davies, J.J. Subleski, N.Maio, M. Gonzalez-Cotto, C. Andrews // *Nature Communications*.-2018.-Vol. 9,№ 5099.-P.372-391.
21. Ángel, J. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer/ J. Ángel, N. Ávila, J. M. Adrover, A. Hidalgo // *Immunity*. - 2017. - Т. 46, №1. – P.15-28.
22. Москалёв, А. В. Нейтрофилы, их современная характеристика в иммуновоспалительном процессе / А. В. Москалёв // V Лужские научные чтения. Современное научное знание: теория и практика. - 2017. - С. 164-167.
23. Анисимова, Н.Ю., Фагоцитарная активность нейтрофилов крови у онкологических больных с сепсисом / Н.Ю. Анисимова, Е.Г. Громова, Л.С. Кузнецова // *Вестник службы крови России*.-2011. - С. 31-33.
24. Kobayashi, Y. Neutrophil biology: an update / Y. Kobayashi // *EXCLI Journal*.-2015.-Vol.14.-P. 220–227.
25. Савченко, А.А. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний / А.А. Савченко, И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов // *Russian Journal of Infection and Immunity*.-2017.-Vol.7, № 4.-P. 327–340.
26. Sionov, R. V. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment / R. V. Sionov, Z.G. Fridlender, Z. Granot // *Cancer Microenviron*.- 2015.-Vol.8,№3.-P.125–158.
27. Савченко, А.А. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода / А.А. Савченко, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, И.И. Гвоздев // *Russian Journal of Infection and Immunity*.-2017. - С. 259–270.
28. Савченко, А.А. Фенотипический состав и хемиллюминесцентная активность моноцитов у больных почечно-клеточным раком / А.А. Савченко, А.Г. Борисов, А.А. Модестов, А.В. Мошев, И.В. Кудрявцев // *Медицинская иммунология*. - 2015. - Т. 17, № 2. - С. 141–150.

29. Kumari, S. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival / S. Kumari, A. K. Badana, M. Mohan, G. Shailender, R. Malla // *Biomark. Insights*.-2018.Vol.13.-P.137-154.
30. Belikov, A. V.T cells and reactive oxygen species / A. V. Belikov, B. Schraven, L. Simeoni // *Journal of Biologicalscience*.-2015.- Vol. 22, №1.-P.1-11.
31. Yang, H. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy / H. Yang, R. M. Villani, H. Wang, M. J. Simpson, M. S. Roberts, M. Tang, X. Liang // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*.-2018.- Vol.37, №266.-P.1-10.
32. Assi, M. The Differential Role of Reactive Oxygen Species in Early and Late Stages of Cancer / M. Assi // *J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*.-2017.- Vol.- 313.-P.646–653.
33. Wilkie-Grantham, R.P. Myeloperoxidase-dependent lipid peroxidation promotes the oxidative modification of cytosolic proteins in phagocytic neutrophil / R. P. Wilkie-Grantham, N. J. Magon, D.T. Harwood, A.J. Kettle, M. C. Vissers // *Journal of Biological Chemistry*.-2015.-Vol.290, № 9896.-P.905-916.
34. Segal, A. W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals / A. W. Segal // *Int J. Biochem. Cell Biol*.-2008.-Vol. 40, №4.-P. 604–618.
35. Nguyen, G.T. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance / G.T. Nguyen, E. R. Green, J. Mecsas // *Cell. Infect. Microbiol*.-2017.-Vol.7.-P.373-389.
36. Liu, F.C. A novel NOX₂ inhibitor attenuates human neutrophil oxidative stress and ameliorates inflammatory arthritis in mice / F.C. Liu, H.P. Yu, P.J. Chen, H.W. Yang, S.H. Chang, C.C. Tzeng, W.J. Cheng, Y.R. Chen // *Redox Biology*.-2019.-Vol. 26,№ 101273.-P.986-992.
37. Shkapova,E. A. Lucigenin- and Luminol-Dependent Chemiluminescence of Blood Neutrophils in Patients with Renal Cancer / E. A. Shkapova, L. M.

Kurtasova, A. A. Savchenko// Bulletin of Experimental Biology and Medicine volume.-2010.-Vol.149.-P.239–241.

38. Владимиров, Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях/ Ю. А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал.-2001.-Т.7.-С.16-23.

39. Шкапова, Е.А. Показатели люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком почки / Е.А. Шкапова, Л.М. Куртасова, А.А. Савченко // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 2010. - Т. 149, № 2.- С. 201–203.

40. Khan, P. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses / P. Khan, D. Idrees, M. A. Moxley, J. A. Corbet, F. Ahmad, G. Figura // Appl. Biochem. Biotechnol.- 2015.-Vol.173,№2.- P.333-335.

41.Zeng, M.Y. The Roles of NADPH Oxidase in Modulating Neutrophil Effector Responses / M.Y. Zeng, I. Miralda, C. L. Armstrong, S. M. Uriarte, J. Bagaitkar //Mol. Oral. Microbiol.- 2019.-Vol.34(2).-P.27-38.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
институт
Кафедра Медицинской биологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишанокая

подпись инициалы, фамилия

« 3 » 07 2020г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Состояние респираторного взрыва нейтрофилов
при онкологических заболеваниях

тема

Руководитель


подпись, дата

профессор, д.м.н.
должность, ученая степень

Савченко А.А.

Выпускник


3.07.20
подпись, дата

Сараева К.Р.

Красноярск 2020г.