

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО СТАТУСА ЛИМФОЦИТОВ И КИСЛОРОДЗАВИСИМОГО МЕТАБОЛИЗМА НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

Р.А. Зуков^{1,2}, Е.В. Слепов^{2}, Л.М. Куртасова¹, Е.В. Инжееваткин^{1,3}*

¹Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск

²Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского, 660133, Красноярск, 1 Смоленская ул., 16; *эл. почта: slepov99@mail.ru

³Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма Федерального Исследовательского Центра Красноярского Научного Центра СО РАН, Красноярск

Исследована активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов и особенности кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови у больных почечно-клеточным раком (ПКР). Обнаружено, что в лимфоцитах возникают условия для замедления реакций энергетического обмена и усиления перехода интермедиатов ЦТК в реакции обмена аминокислот, а также уменьшение активности глутатионредуктазы (ГР). Через 14 дней после радикальной нефрэктомии отмечается стимуляция гликолиза и рост активности ГР. В дальнейшем, через 30 дней после операции, формируются условия для увеличения эффективности энергетического обмена. При этом наблюдается повышение фонового уровня хемилюминесцентного ответа нейтрофилов крови больных ПКР как до, так и после операции. Однако в функциональном нагрузочном тесте выявлено понижение адаптационных возможностей нейтрофильных гранулоцитов в период до операции и через 30 дней после хирургического лечения.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак; лимфоциты; нейтрофилы; ферменты; метаболизм; хемилюминесценция

DOI: 10.18097/PBMC20226806470

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время получены многочисленные данные, подтверждающие важную роль иммунной системы в механизмах противоопухолевой защиты. В то же время известно, что от функциональной активности лимфоцитов — основного структурно-функционального элемента иммунной системы — зависит способность организма к оптимальной реализации иммунного ответа. При этом полноценное проявление функциональных возможностей лимфоцитов происходит только при соответствующем состоянии внутриклеточных метаболических реакций [1, 2].

Известно, что при развитии реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) крови человека после их инкубации с фитогемагглютинином наблюдается увеличение потребления АТФ и повышение активности ферментов гликолиза и цикла Кребса [3]. Доказано влияние внутриклеточной концентрации аденозина и АДФ на экспрессию CD-антигенов на клеточных мембранах лимфоцитов крови [4]. Обнаружено, что глутатион может непосредственно модулировать пролиферацию Т-лимфоцитов. Лимфоциты, истощённые по глутатиону, не развивают в полной мере РБТЛ на митогенные лектины [5, 6]. У людей с выраженной ферментопатией по глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе скорость РБТЛ значительно замедлена [7].

Известно, что причинами развития некоторых первичных иммунодефицитных состояний являются генетически детерминированные дефекты ряда внутриклеточных ферментов. Например, иммунодефицит, развивающийся в результате

недостаточной активности ферментов пуринового обмена, приводит к избыточному накоплению АТФ в клетке, а это, в свою очередь, препятствует созреванию Т-лимфоцитов [8].

К показателям, наиболее информативно отражающим основные параметры внутриклеточного метаболизма лимфоцитов, относится активность окислительно-восстановительных ферментов. Это связано с тем, что являясь основными переносчиками электронов в клетке, они осуществляют ключевые реакции клеточного метаболизма и координируют сопряжённые метаболические пути, участвуя как в энергетических, так и пластических процессах [1, 9, 10].

К настоящему времени доказана способность нейтрофильных гранулоцитов к выраженному цитотоксическому действию на опухолевые клетки, что отражает один из механизмов противоопухолевой резистентности организма [11, 12]. При этом необходимо отметить, что цитопатическое действие нейтрофилов связано, главным образом, с генерацией активных форм кислорода (АФК). Так называемый кислородный или “респираторный взрыв” относится к метаболическим процессам, имеющим место при активации нейтрофилов, и характеризуется увеличением потребления кислорода и усилением окисления глюкозы в пентозофосфатном цикле (ПФП). В результате этого образуются АФК, обладающие биоцидным действием и, в том числе, обеспечивающие цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток [13-15]. “Респираторный взрыв” осуществляет мембраноассоциированная NADPH-оксидаза за счёт реакции окисления NADPH, образующегося при окислении глюкозы, и восстановления молекулы

кислорода до супероксид-анион радикала [14-16]. Одним из методов регистрации интенсивности “респираторного взрыва” является хемилюминесценция.

Учитывая вышеперечисленное, целью настоящего исследования было изучение показателей активности NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов и кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови у больных почечно-клеточным раком (ПКР) в период до оперативного вмешательства и в динамике через 14 и 30 дней после хирургического лечения.

МЕТОДИКА

Исследование было проведено на базе Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского. В него были включены пациенты с местно-распространённым почечно-клеточным раком (ПКР) до хирургического лечения ($n=100$), а также в динамике через 14 дней ($n=90$) и 30 дней ($n=44$) после оперативного вмешательства. Контрольную группу составили 35 клинически здоровых доноров крови.

Проведено открытое клиническое ретроспективное исследование. Критериями включения в исследование были:

- возраст пациентов 45-55 лет;
- гистологически верифицированный почечно-клеточный рак (ПКР);
- 3-я стадия заболевания ($T_3N_0M_0$);
- хирургическое лечение — радикальная нефрэктомия;
- подписание пациентом информированного согласия на участие в исследовании.

Критериями исключения были:

- наличие злокачественной опухоли другой локализации;
- проведение химио- или лучевой терапии;
- тяжёлая сопутствующая патология.

У участников исследования брали образцы венозной крови, из которой центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) выделяли лимфоциты [16]. При контроле морфологического состава лейкоцитарной взвеси определяли чистоту выхода лимфоцитов, составляющую не менее 97%.

В лимфоцитах биолюминесцентным методом определяли активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ, КФ 1.1.1.8), NAD- и NADH-зависимых реакций лактатдегидрогеназы (NAD-ЛДГ, NADH-ЛДГ, КФ 1.1.1.27), NAD- и NADH-зависимых реакций малатдегидрогеназы (NAD-МДГ, NADH-МДГ, КФ 1.1.1.37), NAD- и NADH-зависимых реакций глутаматдегидрогеназы (NAD-ГДГ, NADH-ГДГ, КФ 1.4.1.2), NADP- и NADPH-зависимых реакций глутаматдегидрогеназы (NADP-ГДГ, NADPH-ГДГ, КФ 1.4.1.4), NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы (NAD-ИЦДГ, КФ 1.1.1.41), NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы (NADP-ИЦДГ, КФ 1.1.1.42),

малатдегидрогеназы декарбоксилирующей (NADP-МДГ, КФ 1.1.1.40) и глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) [17].

Спонтанную и индуцированную люминол- и люцигенин-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов периферической крови оценивали методом de Sole и соавт. [18]. Определяли следующие параметры: время выхода на максимум (T_{\max}), максимальное значение (I_{\max}), площадь под хемилюминесцентной кривой (S). В качестве индуктора дыхательного взрыва использовали опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл (“Sigma”, США). Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном ($S_{\text{инд}}$), относительно спонтанной хемилюминесценции ($S_{\text{спон}}$) оценивали соотношением $S_{\text{инд}}/S_{\text{спон}}$. Данный показатель считали индексом активации.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 10.0. Нормальность распределения устанавливали с применением критерия Шапиро-Уилка, который показал, что часть рассматриваемых параметров не подчиняется нормальному распределению, в то время как часть параметров имеет гауссово распределение. Поэтому для проверки значимых различий между группами применяется как t-критерий Стьюдента, так и U-критерий Манна-Уитни. Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены средним арифметическим и стандартной ошибкой среднего ($M \pm SEM$), а также в виде медианы и интерквартильного разброса (Me , C_{25} , C_{75}). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных, представленных в таблице 1, у больных ПКР в период до хирургического лечения наблюдается снижение активности Г6ФДГ в 2,7 раза по сравнению с параметрами контрольной группы ($p_1 < 0,05$). Г6ФДГ является ключевым ферментом пентозофосфатного пути, роль которого заключается в регенерации NADPH и синтезе рибозо-5-фосфата. NADPH в дальнейшем используется в качестве донора водорода в реакциях синтеза липидов и при регенерации восстановленного глутатиона, а рибозо-5-фосфат необходим для синтеза нуклеотидов [10, 19, 20].

Активность ГР лимфоцитов больных ПКР в тот же период снижалась в 6,2 раза ($p < 0,001$), что в сочетании со снижением активности Г6ФДГ может свидетельствовать об уменьшении способности клеток осуществлять регенерацию восстановленного глутатиона — одного из важнейших клеточных антиоксидантов [1, 21, 22].

Результаты исследования выявили снижение в 9,7 раза ($p < 0,01$) активности NADH-ЛДГ в лимфоцитах крови у больных ПКР до операции относительно контрольных величин, а также увеличение в 3,2 раза активности NADH-ГДГ (табл. 1). Исходя из того, что NADH-ЛДГ участвует в анаэробном гликолизе, образуя лактат из пирувата,

МЕТАБОЛИЗМ ЛИМФОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ РАКЕ ПОЧКИ

Таблица 1. Показатели активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у больных ПКР, Ме [25; 75]

Показатель	Контрольная группа (n=35)	Больные ПКР		
		До операции (n=100)	14 дней после операции (n=90)	30 дней после операции (n=44)
Г6ФДГ	3,11 [0,53-6,24]	1,14 [0,15-3,87] $p_1<0,05$	1,24 [0,21-4,64] $p_1<0,05$	0,46 [0,01-2,03] $p_1<0,01; p_3<0,05$
Г3ФДГ	0,00 [0,00-1,01]	0,15 [0,00-4,19]	1,26 [0,00-4,55] $p_2<0,001$	0,09 [0,00-2,50]
NAD-ЛДГ	11,53 [2,37-20,34]	15,50 [1,45-66,04]	17,64 [5,21-61,82] $p_1<0,05$	7,85 [1,51-27,52]
NADP-МДГ	0,33 [0,00-1,14]	0,11 [0,00-0,64]	0,09 [0,00-0,54]	0,08 [0,00-0,38]
NADP-ГДГ	0,53 [0,00-4,52]	0,25 [0,01-2,69]	0,51 [0,02-5,29]	0,64 [0,00-2,48]
NADP-ИЦДГ	2,99 [1,87-6,32]	1,74 [0,04-20,63]	4,22 [0,32-19,73]	1,96 [0,37-5,35]
NAD-МДГ	4,58 [0,00-11,61]	69,39 [0,00-200,33]	58,34 [0,56-198,61]	32,26 [0,00-114,78] $p_1<0,01$
NAD-ГДГ	4,24 [0,00-15,48]	7,85 [0,00-69,24]	6,49 [0,00-36,01]	8,63 [0,00-28,01]
NAD-ИЦДГ	0,56 [0,00-13,79]	0,51 [0,00-8,99]	0,66 [0,00-8,47]	0,21 [0,00-3,22]
NADH-ЛДГ	30,57 [0,00-52,46]	3,07 [0,00-28,35] $p_1<0,01$	2,84 [0,00-24,46] $p_1<0,01; p_2<0,001$	0,00 [0,00-16,51] $p_1<0,01$
NADH-МДГ	58,13 [24,98-114,15]	74,76 [27,10-106,34]	70,83 [30,51-145,64]	58,18 [27,51-95,54]
ГР	13,82 [7,24-36,74]	2,24 [0,04-7,74] $p_1<0,001$	4,39 [0,10-14,31] $p_1<0,01; p_2<0,05$	1,30 [0,00-7,63] $p_1<0,01$
NADH-ГДГ	5,19 [0,00-22,70]	16,49 [6,33-47,68] $p_1<0,05$	22,55 [7,51-48,62] $p_1<0,01$	25,18 [5,19-32,28] $p_1<0,05$
NADPH-ГДГ	25,20 [11,20-46,79]	15,34 [3,99-41,81]	25,85 [6,97-60,67]	25,27 [1,95-43,80]

Примечание. Здесь и в таблице 2: p_1 – статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p_2 – статистически значимые различия с показателями больных ПКР до хирургического лечения; p_3 – статистически значимые различия с показателями больных ПКР через 14 дней после операции.

а NADH-ГДГ осуществляет перенаправление α -кетоглутарата из ЦТК на синтез глутамата, можно предположить снижение интенсивности субстратного потока от гликолиза к реакциям ЦТК и увеличение оттока субстратов с ЦТК на реакции аминокислотного обмена [1, 9, 23].

Через 14 дней после хирургического лечения у больных ПКР в лимфоцитах периферической крови сохранялся пониженный уровень активности Г6ФДГ и повышенный уровень NADH-ГДГ. В этот период была повышена активность NAD-ЛДГ и Г3ФДГ по сравнению с контрольной группой, дооперационным периодом и спустя 30 дней после операции. Г3ФДГ осуществляет превращение глицерол-3-фосфата в диоксиацетонфосфат, тем самым вовлекая субстраты липидного обмена в гликолиз. Кроме того,

Г3ФДГ является компонентом глицерофосфатного челночного механизма, обеспечивающего поступление восстановительных эквивалентов из цитозоля в дыхательную цепь митохондрий [1, 24]. Следовательно, увеличение активности Г3ФДГ, вместе с увеличением активности NAD-ЛДГ, будет способствовать усилению интенсивности энергетического обмена в лимфоцитах.

При этом активность ГР остаётся пониженной в 3,2 раза ($p<0,01$) по сравнению с контрольной группой, однако повышается в 2 раза ($p<0,05$) относительно дооперационного периода.

Через 30 дней после хирургического лечения у больных ПКР в лимфоцитах периферической крови продолжалось снижение активности Г6ФДГ, NADH-ЛДГ и ГР и сохранялся повышенный

Таблица 2. Показатели хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у больных раком почки, Ме [25; 75]

Показатель	Контрольная группа (n=35)	Больные ПКР		
		До операции (n=100)	14 дней после операции (n=90)	30 дней после операции (n=44)
Спонтанная хемилюминесценция				
T _{max} , с	505,50 [208,50-1502,50]	696,00 [298,00-1293,00]	707,00 [396,50-1139,00]	723,00 [393,00-1118,00] p ₁ <0,01
I _{max} , о.е.×10 ³	6,67 [3,04-18,70]	23,16 [11,64-41,34]	23,26 [11,88-36,69]	22,64 [7,02-42,98]
S _{сп} , о.е.×10 ⁵	2,06 [1,23-4,60]	5,85 [3,53-11,90]	6,38 [3,27-12,20]	6,65 [3,40-13,90] p ₁ <0,001
Индукцированная хемилюминесценция				
T _{max} , с	1270,00 [862,00-1779,00]	10,52,00 [1680,00-2525,00]	1049,00 [784,00-1431,00] p ₃ <0,01	1198,00 [825,00-1821,00]
I _{max} , о.е.×10 ³	10,54 [4,98-41,70]	27,21 [11,76-65,31]	41,49 [18,28-84,59]	45,54 [21,26-74,50] p ₂ <0,05
S _{инд} , о.е.×10 ⁵	3,78 [1,53-9,40]	8,46 [3,98-20,10] p ₂ <0,05	14,75 [5,27-27,10]	21,50 [5,88-29,90] p ₂ <0,05
S _{инд} /S _{сп}	1,87 [1,52-3,00]	1,61 [1,02-2,42]	1,84 [1,14-3,57]	2,34 [1,43-3,70] p ₂ <0,05

уровень NADH-ГДГ по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 1). При этом наблюдался семикратный рост ($p < 0,01$) активности NAD-МДГ относительно контрольных значений. Следует отметить, что в данный период происходит снижение в 2,7 раза ($p < 0,05$) уровня активности Г6ФДГ по сравнению с величинами, зарегистрированными через 14 дней после операции.

Исследование параметров хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови выявило в группе больных ПКР в период до хирургического лечения ускорение времени выхода на максимум, повышение максимального уровня хемилюминесценции и площади под кривой для спонтанной хемилюминесцентной реакции относительно аналогичных параметров контрольной группы (табл. 2).

Изучение показателей зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови в период до операции позволило обнаружить увеличение площади под стимулированной хемилюминесцентной кривой на фоне понижения индекса активации в группе больных ПКР по сравнению с величинами группы контроля (табл. 2). При этом средний уровень хемилюминесцентного свечения и время реагирования на стимул не имели статистически значимых различий с контрольными значениями (табл. 2).

Результаты исследования показателей фоновой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у больных ПКР в период через 14 дней после оперативного вмешательства показывают замедление времени выхода на максимум хемилюминесцентной кривой относительно значений,

зафиксированных в период до хирургического лечения (табл. 2). Следует отметить сохранение повышенного уровня свечения и площади под спонтанной хемилюминесцентной кривой, по сравнению с контрольными показателями (табл. 2).

При оценке параметров зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных ПКР в период через 14 дней после радикальной нефрэктомии выявлено повышение интенсивности хемилюминесцентного ответа, а также увеличение площади под стимулированной хемилюминесцентной кривой относительно показателей, зарегистрированных в период до операции и в группе контроля (табл. 2).

Кроме того, в данный период наблюдения у больных ПКР было отмечено увеличение почти в 2 раза ($p < 0,01$) индекса активации хемилюминесцентной реакции нейтрофилов по сравнению с величинами, установленными в период до хирургического лечения.

Изучение параметров хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови у больных ПКР в период через 30 дней после оперативного вмешательства показало замедление выхода на пик спонтанной хемилюминесцентной кривой относительно показателей контрольной группы и значений, зафиксированных в период до и через 14 дней после хирургического лечения (табл. 2). Необходимо отметить, что в данный период наблюдения сохраняется повышение интенсивности “респираторного взрыва” и увеличение площади под спонтанной хемилюминесцентной кривой по сравнению с параметрами группы контроля (табл. 2).

При индукции хемилюминесцентной реакции зимозаном установлено сохранение увеличения площади под стимулированной хемилюминесцентной кривой и удлинение времени реагирования на стимуляцию относительно показателей контрольной группы (табл. 2). Кроме того, почти в 2 раза ($p < 0,05$) снижаются средние значения индекса активации по сравнению с величинами контроля.

В целом, увеличение общего количества АФК, продуцированных нейтрофилами периферической крови у больных ПКР до хирургического лечения, относительно контроля свидетельствует о повышенных энергетических затратах нейтрофилов крови у пациентов с исследуемой патологией. При этом, дополнительная стимуляция "респираторного взрыва" нейтрофилов, опсонизированным зимозаном, не приводит к увеличению продукции АФК, что отражает пониженные резервные метаболические возможности данной клеточной популяции [13]. Очевидно, что обнаруженные нарушения кислород-зависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов у больных ПКР в период до операции могут, в определённой мере, снижать цитотоксические эффекты нейтрофилов на опухолевые клетки.

Через 14 дней после оперативного вмешательства отмечается замедление выхода свечения на пик при высоком уровне хемилюминесцентного ответа нейтрофильных гранулоцитов. Это способствует менее быстрому истощению функционально-метаболической активности клетки [13], что, безусловно, является положительным изменением у больных ПКР в данный период наблюдения.

Повышение величины индекса активации в период через 14 дней после хирургического лечения у больных ПКР свидетельствует о том, что в этот период нейтрофилы более интенсивно синтезируют АФК, чем в период до операции, и отражает значительное напряжение кислородного метаболизма нейтрофилов периферической крови у больных в послеоперационном периоде.

Следует отметить, что повышенный уровень фонового кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов, наблюдаемый у больных ПКР в период через 30 дней после хирургического лечения, приводит к замедленной реализации клетками своих синтетических способностей, менее интенсивному поступлению NADPH из пентозофосфатного пути, необходимого для продукции АФК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных ПКР в лимфоцитах периферической крови в результате изменения активности ферментов возникают условия для замедления реакций энергетического обмена и усиления перехода интермедиатов ЦТК в реакции обмена аминокислот, а также для уменьшения активности глутатионзависимой антиоксидантной защиты вследствие снижения активности ГР. Через 14 дней после радикальной нефрэктомии отмечается стимуляция гликолиза и рост активности ГР.

В дальнейшем, через 30 дней после операции, формируются условия для увеличения эффективности энергетического обмена.

Полученные данные показали повышение фонового уровня хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови у больных ПКР как до операции, так и после хирургического лечения. В то же время, при дополнительной нагрузке *in vitro* в функциональном нагрузочном тесте выявлено понижение адаптационных возможностей нейтрофильных гранулоцитов к мобилизации резервной метаболической активности в период до операции и через 30 дней после хирургического лечения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено на заседании локального этического комитета Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского (протокол №28-15 от 03.11.2015 г.). Все пациенты подписали формы информированного согласия об участии в исследовании и предоставлении биологического материала для изучения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савченко А.А., Борисов А.Г. (2012) Основы клинической иммунометаболомики, Наука, Новосибирск, 263 с. [Savchenko A.A., Borisov A.G. (2012) Fundamentals of clinical immunometabolomics, Science, Novosibirsk, 263 p.]
2. McLeod I.X., Jia W., He Y.W. (2012) The contribution of autophagy to lymphocyte survival and homeostasis. Immunol. Rev., **249**(1), 195-204. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01143.x
3. Zhou H., Wu Z., Ma L., Wu W., Yang S., Wang Q., Yuan X., Wu L., Lin X., Tan J. (2011) Assessing immunologic function through CD4 T-lymphocyte adenosine triphosphate levels by ImmunoKnow assay in Chinese patients following renal transplantation. Transplant. Proc., **43**(7), 2574-2578. DOI: 10.1016/j.transproceed.2011.04.012
4. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Семенова Л.Ю. (1995) Изучение влияния медиаторов тканевого происхождения на экспрессию поверхностных антигенов лимфоцитов человека *in vitro*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, №2, 196-199. [Poryadin G.V., Salmasi Zh.M., Kazimirsky A.N., Semenova L.Yu. (1995) Study of the effect of mediators of tissue origin on the expression of surface antigens of human lymphocytes *in vitro*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, No. 2, 196-199.]

5. Fisher G., Schwartz D.D., Quindry J., Barberio M.D., Foster E.B., Jones K.W., Pascoe D.D. (2011) Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. *J. Appl. Physiol.*, **110**(3), 730-737. DOI: 10.1152/jappphysiol.00575.2010
6. Hamed Y.B., Medjdoub A., Kara B.M., Merzouk H., Villemain D., Narce M. (2012) 5,6-dihydro-2H-pyranones and 5,6-dihydro-2H-pyridones and their derivatives modulate *in vitro* human T lymphocyte function. *Mol. Cell. Biochem.*, **360**(1-2), 23-33. DOI: 10.1007/s11010-011-1040-x
7. Рагимов А.А., Байрамалибеи И.Э. (1985) Розеткообразующая способность и пролиферативная активность лимфоцитов периферической крови с дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Лабораторное дело, №7, 405-408. [Ragimov A.A., Bairamalibeyli I.E. (1985) Rosette-forming capability and proliferative activity of peripheral blood lymphocytes in subjects with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Laboratornoye Delo*, No. 7, 405-408.]
8. Корсунский И.А., Гордукова М.А., Козлов И.Г., Продеус А.П., Корсунский А.А. (2017) Клинические и эпидемиологические аспекты первичных иммунодефицитных состояний и их раннего обнаружения. Медицинская иммунология, **19**(5), 505-512. [Korsunsky I.A., Gordukova M.A., Kozlov I.G., Prodeus A.P., Korsunsky A.A. (2017) Clinical and epidemiological aspects of primary immunodeficiency states and their early detection. *Medical Immunology*, **19**(5) 505-512.] DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-505-512
9. Spanaki C., Plaitakis A. (2012) The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism. *Neurotox. Res.*, **21**(1), 117-127. DOI: 10.1007/s12640-011-9285-4
10. Stanton R.C. (2012) Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, **64**(5), 362-369. DOI: 10.1002/iub.1017
11. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евлевский А.А. (2015) Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на “старых игроков” на иммунологическом поле. Иммунология, **4**, 257-265. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kovaleva S.V., Evglevskiy A.A. (2015) Neutrophilic granulocytes: A new look at the “old players” in the immunological field. *Immunology*, **4**, 257-265.]
12. Milkovic L., Siems W., Siems R., Zarkovic N. (2014) Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. *Curr. Pharm. Des.*, **20**(42), 6529-6542. DOI: 10.2174/1381612820666140826152822
13. Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. (2017) Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний. Инфекция и иммунитет, **7**(4), 327-340. [Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. (2017) Assessment methods and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. *Infection and Immunity*, **7**(4), 327-340.] DOI: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340
14. de Oliveira-junior E.B., Bustamante J., Newburger P.E., Condino-Neto A. (2011) The human NADPH oxidase: Primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand. J. Immunol.*, **73**(5), 420-427. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2010.02501.x
15. Kubota K., Saiwai H., Kumamaru H., Maeda T., Ohkawa Y., Aratani Y., Nagano T., Iwamoto Y., Okada S. (2012) Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury. *Spine*, **37**(16), 1363-1369. DOI: 10.1097/BRS.0b013e31824b9e77
16. Boyum A. (1968) Isolation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand. Clin. Lab. Invest.*, **21**(97), 77-80.
17. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. (1989) Высококчувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах крови биолюминесцентным методом. Лабораторное дело, №11, 23-25. [Savchenko A.A., Suntsova L.N. (1989) Highly sensitive determination of the activity of dehydrogenases in blood lymphocytes by the bioluminescent method. *Laboratornoye Delo*, No. 11, 23-25.]
18. de Sole P., Lippa S., Lixxarru G. (1983) Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to access oxygen-dependent microbial activity of granulocytes. *J. Clin. Lab. Autom.*, **3**, 391-400.
19. Norris M.G., Malys N. (2012) What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **405**(3), 388-392. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.037
20. Tandogan B., Sengezer C., Ulsu N.N. (2011) *In vitro* effects of imatinib on glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase. *Folia Biol. (Praha)*, **57**(2), 57-64.
21. Djukic M.M., Jovanovic M.D., Ninkovic M., Stevanovic I., Ilic K., Curcic M., Vekic J. (2012) Protective role of glutathione reductase in paraquat induced neurotoxicity. *Chem. Biol. Interact.*, **199**(2), 74-86. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.05.008
22. Инжеваткин Е.В., Савченко А.А., Слепов Е.В., Хлебопрос Р.Г. (2014) Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов мышей после введения 1×10^4 клеток асцитной карциномы Эрлиха. Сибирское медицинское обозрение, **1**, 25-30. [Inzhevatkin E.V., Savchenko A.A., Slepov E.V., Khlebopros R.G. (2014) Activity of NAD(P)-dependent mouse lymphocyte dehydrogenases after injection of 1×10^4 Ehrlich ascitic carcinoma cells. *Siberian Medical Review*, **1**, 25-30.]
23. Li M., Li C., Allen A., Stanley C.A., Smith T.J. (2012) The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **519**(2), 69-80. DOI: 10.1016/j.abb.2011.10.015
24. de la Roche M., Tessier S.N., Storey K.B. (2012) Structural and functional properties of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from a mammalian hibernator. *Protein J.*, **12**(2), 109-119. DOI: 10.1007/s10930-011-9376-3

Поступила в редакцию: 23. 08. 2022.

После доработки: 25. 11. 2022.

Принята к печати: 07. 12. 2022.

LYMPHOCYTES ENZYMATIC STATUS AND PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS
OXYGEN-DEPENDENT METABOLISM IN PATIENTS WITH RENAL CANCER

R.A. Zukov^{1,2}, E.V. Slepov^{2}, L.M. Kurtasova¹, E.V. Inzhevatin^{1,3}*

¹Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

²A.I. Kryzhanovsky Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Center,

16, 1ya Smolenskaya str., Krasnoyarsk, 660133 Russia; *e-mail: slepov99@mail.ru

³International Scientific Center of Extremal Organism State Research, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia

The immune system, one of the most important homeostatic organism systems, is actively involved in the protection against malignant tumors. The earliest signs of immune homeostasis disorders should be investigated at the cellular level, because of cell functional manifestations depend on the state of intracellular metabolic reactions. The study of lymphocyte NAD(P)-dependent dehydrogenases activity and peripheral blood neutrophils oxygen-dependent metabolism in patients with renal cellular carcinoma (RCC) showed a decrease in the intensity of ribose-5-phosphate and NADH-dependent synthetic processes, inhibition of terminal reactions of glycolysis. Altered activities of the studied enzymes favor an increase in outflow of intermediates of the Krebs cycle on the reaction of amino acid metabolism in peripheral blood lymphocytes. Radical nephrectomy was accompanied by increased activity of glycolysis. The basal level chemiluminescent of peripheral neutrophils of RCC patients response was higher both before and after operations. Stimulation of neutrophils by opsonized zymosan *in vitro* leads to increase in oxidative metabolism activity, most in 14 days after surgery period. Before and 30 days after surgery, adaptive metabolic capabilities of neutrophilic granulocytes decreased.

Key words: renal cell carcinoma; lymphocytes; neutrophils; enzymes; metabolism; chemiluminescence

Funding. The study was carried out as a government task part.

Received: 23.08.2022; revised: 25.11.2022; accepted: 07.12.2022.