

Семенова А.Б.^{1,2}, Казачков Е.Л.¹, Долгушин И.И.¹, Важенин А.В.^{1,2}

Формирование нейтрофильными гранулоцитами сетей внеклеточной ДНК как дополнительный диагностический критерий степени злокачественности карцином молочной железы

1 - ГБОУ ВПО ЮУМУ Минздрава России, г. Челябинск; 2 - ГБУЗ «ЧОКОД», г. Челябинск

Semenova A.B., Kazachkov E.L., Dolgushin I.I., Vazhenin A.V.

The formation process of extracellular DNA – additional diagnostic criterion for definition grade of breast carcinoma

Резюме

Нейтрофильные гранулоциты, являясь постоянным элементом в составе микроокружения опухолей, играют неоднозначную роль в онкогенезе. В ответ на появление опухолевых клеток, нейтрофилы активно формируют во внеклеточном пространстве сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – нейтрофильные внеклеточные ловушки. Нами было показано, что в ткани карциномы молочной железы рядом с опухолевыми клетками диффузно и скоплениями распределяется внеклеточная ДНК. Установлено, что нейтрофилы при встрече с опухолевыми клетками активируются и начинают формировать внеклеточные сети ДНК вокруг них с различной интенсивностью в зависимости от уровня пролиферативной активности опухоли.

Ключевые слова: карцинома молочной железы, нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные сети ДНК

Summary

Neutrophil granulocytes, being a permanent structure in the palette of the «microenvironment» tumors lay a different role in oncogenes. In response to tumor cells incentives neutrophils actively shape in the extracellular space setuptable structure consisting of nucleic acids and enzymes - neutrophil extracellular nets. It was noticed, that in the tumor tissue, breast carcinoma near the tumor cells is diffuse and clusters distributed free cell DNA. It has been shown that neutrophils when meeting with tumor cells become activated and begin to form a free cell extracellular DNA around them with various level proliferation activity.

Key words: carcinoma of the breast, neutrophils, neutrophil extracellular nets

Введение

Нейтрофилы – это секреторные клетки, способные выделять биологически активные продукты, с помощью которых способны осуществлять внеклеточный киллинг и, вступая в медиаторные контакты с гуморальными системами, клетками крови и соединительной ткани, могут оказывать регуляторное действие [1,2].

По данным литературы, нейтрофилы, являясь компонентом воспалительно-клеточного вала в параканкрозной зоне, обладают не только противоопухолевыми свойствами, но и обнаруживают проопухолевые потенции, усиливая ангиогенез и метастазирование. При этом ключевую роль в регрессии опухолей отводят активным формам кислорода, азота и некоторым цитокинам, продуцируемым также нейтрофилами [3-5].

Показано, что в ответ на встречу с опухолевой клеткой нейтрофилы активно формируют во внеклеточ-

ном пространстве сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – внеклеточные сети ДНК (Neutrophil Extracellular Traps – NETs) [6,7], которые некоторые авторы обозначают как «ловушки». Существует мнение, что последние могут захватывать циркулирующие опухолевые клетки, тем самым способствуя метастазированию [4,8].

Исследуя микропрепараты и мазки отпечатки карцином молочной железы, мы также обнаружили, что в ткани опухоли рядом с клетками новообразования периклеллярно либо диффузно распределяется внеклеточная ДНК в виде сетей, выраженная по-разному в зависимости от типа карциномы в различном количестве [9,10].

В связи с изложенным, целью настоящего исследования явилось изучение процессов формирования нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК при встрече с клетками карциномы молочной железы различных молекулярно-биологических типов.

Материалы и методы

Забор ткани опухоли молочных желез у 100 оперированных пациенток забирали из операционного материала в течение 10 мин после радикальной мастэктомии по Маддену или Пэй-ти. Манипуляцию осуществляли стерильным скальпелем с помещением материала в контейнер одноразового использования. Диагноз был ранее гистологически верифицирован, и с учетом гистогенетической формы опухоли мы сформировали следующие группы: инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типаламинального типа А (20 пациенток); люминального типа ВHER2 негативного (20 больных); люминального типа В HER2 позитивного (20 женщин); HER2 позитивного типа нелюминального типа (20 пациенток); тройного негативного типа (20 человек). Кроме того, все карциномы различных молекулярно-биологических типов разделили на 3 подгруппы по уровню пролиферативной активности опухолевых клеток (Ki67): 2-20%, 21-60% и 61-100%.

Молочная железа рассекалась в проекции опухоли, забирался фрагмент с периферии узлового образования с окружающей тканью 0,5 см × 0,5 см × 0,2 см. После этого ткань опухоли в гомогенизаторе измельчалась механически до получения гомогенной мелкодисперсной массы. Для механического разрушения соединительной ткани и высвобождения опухолевых клеток к взвеси гомогенизированной ткани опухоли добавляли трипсин в концентрации 0,25%, в соотношении 1:5. Полученную смесь инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 мин, центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 20 мин. Образовавшуюся надосадочную жидкость сливали, осадок отмывали и доводили разведением стерильным физиологическим раствором хлорида натрия до концентрации 0,5 × 10⁶ клеток/мл, используя для контроля унифицированный метод подсчета клеток в камере Горяева.

При проведении эксперимента для оценки жизнеспособности опухолевых клеток после проведенных процедур к 0,2 мл суспензии ткани опухоли добавляли 0,02 мл 1% раствора трипанового синего. Полученный материал помещали в камеру Горяева и исследовали в световом микроскопе. Подсчет производили на 100 клеток. Живыми прозрачными (трипано-негативными) оставалось более 80% клеток, погмбало до 20% клеток, которые окрашивались трипановым синим в фиолетовый цвет (трипанопозитивные клетки).

Для определения уровня пролиферативной активности иммунофенотипирования опухоли осуществлялось с помощью моноклональных антител (МКАТ) (Dako, Дания) кKi-67 (СlopeMIB-1). Кроме того, препараты окрашивались с помощью и поликлональных антител к милопероксидазе. Иммуногистохимическое исследование проведено на Autostainer Plus (Dako). Обработка материала выполнена с использованием Target Retrieval Solution в PTLINK (Dako) при условиях 97°C (20 мин).

Взятие материала периферической крови 20 здоровых доноров для анализа производилось одноразовыми инструментами (иглами) в пробирки одноразового ис-

пользования в 8.00 часов утра в день проведения операции у пациенток с карциномой молочной железы. Для получения нейтрофилов использовали 15,0 мл гепаринизированной (10-15 ЕД/мл гепарина) периферической венозной крови. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси на двойном градиенте плотности стерильных растворов фиколла-урографина (Pharmacia, Швеция; Шеринг, Германия). Плотности верхнего слоя градиента составляла 1,075-1,077 г/мл, нижнего – 1,093-1,095 г/мл. Каждый градиент используют в объеме 1,5 мл. Через 40 минут центрифугирования при 1500 оборотах в минуту на границе между градиентами образуется кольцо гранулоцитов с чистотой 98-100%, мононуклеары составляют около 2%, либо отсутствуют. Кольцо нейтрофилов аккуратно собирали, переносили в стерильные центрифужные пробирки, отмывали от градиента стерильным физиологическим раствором хлорида натрия путём центрифугирования при 1500 оборотах в минуту дважды по 5 минут, доводили до концентрации 5 × 10⁶ клеток/мл и использовали для оценки функционального статуса нейтрофилов или получения супернатантов.

Далее полученные взвеси опухолевых клеток каждой пациентки карциномой из групп исследования смешивали в соотношении 1:10 с фракциями нейтрофилов здоровых доноров. Полученные взвеси инкубировали в термостате при 37°C в течение 60 мин. После из них изготавливались мазки на предметных стеклах и окрашивались по Романовскому-Гимзе с последующей световой микроскопией с дифференцированием форм лейкоцитов и подсчетом внеклеточной ДНК. Подсчет вели на 300 структур (нейтрофилы сегментоядерные, нейтрофилы юные, сети ДНК свободнолежащие, сети ДНК в непосредственном контакте с опухолевыми клетками).

Для определения функциональной активности нейтрофилов проводили изучение их лизосомальной активности. Для этого определяли интенсивность люминесценции лизосом нейтрофилов, прижизненно окрашенных акридиновым оранжевым. 0,1 мл взвеси нейтрофилов с опухолевыми клетками смешивали с 0,05 мл раствора акридинового оранжевого в концентрации 2 мкг/мл. После 30-минутной инкубации при 37°C клетки помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и под иммерсией исследовали в потоке сине-фиолетового света люминесцентного микроскопа "Люам". Определяли лизосомальную активность - число нейтрофилов, имеющих лизосомальные гранулы (в %), а также подсчитывали индекс суммарной люминесценции лизосом (ИСЛЛ), выраженного в условных единицах. Для этого использовали формулу: $ИСЛЛ = A \times 1 + B \times 3 + C \times 10 + D \times 0$, где А, В, С, D – количество клеток с заполнением цитоплазмы лизосомальными гранулами на "+", "++", "+++" или с их отсутствием соответственно.

Для определения активности внутриклеточного кислородзависимого метаболизма проводили постановку НСТ-теста в модификации А.Н.Маянского, М.К.Виксмана [1]. Учитывали интенсивность спонтанной НСТ-восстанавливающей активности и индуцированной. При учете реакции определяли процент

НСТ-позитивных клеток и интенсивность реакции по формуле: интенсивность НСТ = $(A \times 3 + B \times 2 + C \times 1) / 100$; где А, В, С – число клеток, соответственно, с отложением диформазана, превышающим размеры ядра, занимающим более 1/3 площади цитоплазмы и менее 1/3 площади соответственно.

Результаты и обсуждение

Установлено, что нейтрофилы при встрече с опухолевыми клетками активируются и через 60 мин инкубации выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – нейтрофильные внеклеточные сети ДНК, которые оплетают опухолевые клетки (рис. 1, 2 – эти рисунки к статье см. на специальной цветной вкладке журнала – прим. ред.). В контрольных образцах нейтрофилы сохраняли структуру, жизнеспособность и не формировали внеклеточных сетей ДНК.

При инкубации клеток опухоли различных молекулярно-генетических типов с нейтрофилами выявлено различное количество сетеподобных структур и нейтрофилов с неизменной структурой, в результате чего можно предположить, что не только синтез, но и скорость образования внеклеточных ловушек зависит от клетка-активатора (табл. 1). Так, обнаружено, что при встрече опухолевых клеток карцином люминального типа А с нейтрофилами доноров количество внеклеточных сетей ДНК, сформированных ими, достоверно преобладало над таковыми в группе исследования карцином люминального типа В, HER2 негативного, но имело значительно меньшего уровня, чем при агрессивных формах нелюминальных карцином (тройной негативный тип и HER2 позитивный тип, нелюминальный).

Другими словами, опухолевые клетки карцином молочной железы любого молекулярно-генетического типа являлись клетками-активаторами активности нейтрофилов, но при более агрессивных формах новообразований отмечались максимальные значения исследуемого параметра («ловушек» ДНК). Вместе с тем, установлено, что карциномы люминального типа В, HER2 негативного являются клинически более агрессивными по сравнению с карциномами люминального типа А. При этом недостоверные отличия в активности

формирования нейтрофильных «ловушек» при указанных молекулярно-генетических типах карциномы можно объяснить прочими внешними условиями. В частности, опухоли из люминального эпителия без экспрессии HER2 на мембранах клеток и с наличием большого количества рецепторов к эстрогену и прогестерону имеют примерно одинаковую способность при встрече с нейтрофильными гранулоцитами активировать их в отношении формирования внеклеточных сетей ДНК.

Уменьшение экспрессии на клетках рецепторов к прогестерону (люминальный тип В, HER2 позитивный), наличие гиперэкспрессии HER2 (тройной негативный тип, нелюминальный), а также приближение к базально-клеточной дифференцировке (тройной негативный тип) демонстрирует более выраженную способность к активации нейтрофилов, что подтверждается показателями лизосомальной активности и кислородзависимого метаболизма. По нашим данным, количество лизосом в цитоплазме нейтрофилов, отражающее их функциональную активность и способность к реагированию на внешние воздействия, увеличивалось по сравнению с контрольными пробами. Следует отметить, что наибольшее количество лизосом обнаруживалось в опухолях высокой степени злокачественности с уровнем пролиферативной активности более 60% (табл. 2). При этом почти в два раза увеличивались показатели НСТ-теста в образцах с Ki67 до 60% (индуцированный НСТ-тест) по сравнению с опухолями с более высоким уровнем Ki67 – с $64,22 \pm 3,32$ до $98,34 \pm 6,66$.

Учитывая разнородность происхождения исследуемых типов карцином молочной железы и сходные между различными типами особенности активации нейтрофилов, в том числе и в отношении формирования внеклеточных сетей ДНК, принято решение исследовать зависимость данного показателя от степени злокачественности и пролиферативной активности опухоли. В группу умеренно злокачественных карцином с уровнем пролиферативной активности входят карциномы с Ki67 от 21% до 60%, а именно люминальные карциномы типа В, HER2 негативные и HER2 позитивные, HER2 позитивный тип, нелюминальный; в группу высокозлокачественных карцином отнесены опухоли тройного негативного типа

Таблица 1. Интенсивность образования нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК при встрече с опухолевыми клетками при различных молекулярно-генетических типах карцином молочной железы (суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови)

	Люминальный тип А n = 20	Люминальный тип В HER2 негативный n = 20	Люминальный тип В HER2 позитивный n = 20	HER2 позитивный тип, нелюминальный n = 20	Тройной негативный тип n = 20
Нейтрофилы, юные формы	3,98 ± 0,52	3,54 ± 0,97	3,68 ± 1,11	3,15 ± 0,93	3,99 ± 0,12
Нейтрофилы зрелые, сегментоядерные формы	270,33 ± 22,01	276,31 ± 18,33	266,56 ± 17,05	257,84 ± 8,54	249,06 ± 11,33
Внеклеточные сети ДНК	14,11 ± 0,64 p < 0,001	10,14 ± 0,72 p < 0,001	19,86 ± 1,64 p < 0,001	33,14 ± 2,28 p < 0,001	38,55 ± 5,35 p < 0,001

Таблица 2. Показатели лизосомальной активности нейтрофилов при встрече с опухолевыми клетками при различных уровнях Ki67 карцином молочной железы (суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови)

Суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови	Показатели лизосомальной активности	
	Активность лизосом, %	Индекс люминесценции лизосом, усл. ед.
Ki67 5-20%	68,64±3,12 n = 20	324,47±7,44 n = 20
Ki67 21-60%	72,34±2,33 n = 20	332,22±5,54 n = 20
Ki67 61-100%	98,64±1,02 p<0,001 n = 20	384,08±6,55 p<0,001 n = 20

Таблица 3. Интенсивность образования нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК при встрече с опухолевыми клетками при различных уровнях Ki67 карцином молочной железы (суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови)

	Ki67 5-20% n = 20	Ki67 21-60% n = 65	Ki67 61-100% n = 15
Нейтрофилы, юные формы	3,98 ± 0,52	3,62 ± 0,07	3,94 ± 0,12
Нейтрофилы зрелые, сегментоядерные формы	277,34 ± 8,01	273,71 ± 6,01	253,9 ± 12,33
Внеклеточные сети ДНК	14,1 ± 0,64 p<0,001	19,6 ± 0,06 p<0,001	35,8 ± 0,26 p<0,001

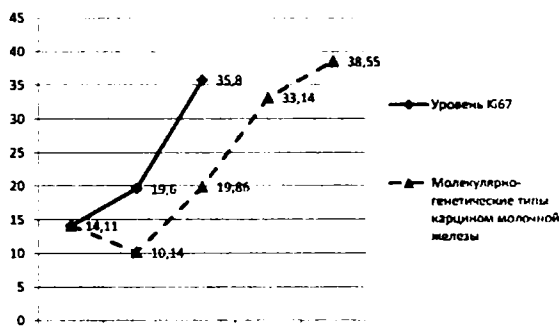


Рис.3. Интенсивность образования нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК при встрече с опухолевыми клетками при различных молекулярно-генетических типах карцином молочной железы и уровнях Ki67. (суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови)

опухолей, карциномы с неопределенным пограничным значением HER2 статуса, а также некоторые наблюдения HER2 позитивного люминального типа В.

Установлено, что высокая интенсивность образования нейтрофильными гранулоцитами при встрече с опухолевыми клетками сетей ДНК находилась в прямой зависимости от повышения уровня Ki67 в опухолях различного молекулярно-генетического профиля, достигая максимума в карциномах с Ki67 от 80-100% (рис. 3, табл. 3).

Заключение

Таким образом, определение способности клеток карцином молочных желез к активации нейтрофилов, в том числе, с формированием ими внеклеточных сетей

ДНК может быть использовано как дополнительный диагностический критерий при экспресс-диагностике определения степени злокачественности опухоли. Полагаем, что данный критерий должен характеризовать не только абсолютное количество сетеподобных структур («ловушек»), но и включать описание их расположения в тканях в контексте морфологических особенностей и комплексной оценки взаимодействия с компонентами микроокружения опухоли при определенном молекулярно-генетическом типе карциномы. Для этого необходимо дальнейшее тщательное изучение палитры составляющих микроокружения карцином различной степени злокачественности с выявлением закономерностей механизмов взаимодействия его компонентов с опухолевыми клетками. ■

Семенова А.Б., к.м.н., зав. лабораторно-диагностической службой ГБУЗ «ЧОКОД», г. Челябинск; **Казачков Е.Л.**, д.м.н., профессор, зав. каф. патологической анатомии и судебной медицины ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; **Долгушин И.И.**, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; **Важенин А.В.** член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой онкологии, лучевой диагностики и лучевой терапии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку - **Семенова Анна Борисовна**, к.м.н., зав. лабораторно-диагностической службой ГБУЗ «ЧОКОД», г. Челябинск. Адрес для переписки: 454082, г. Челябинск, ул. Блюхера 42, тел. (351)232-78-55, e-mail: aсеменова81@mail.ru.

Литература:

1. Маянский Д.Н. Цырендоржиев А.А., Зубахина Д.Д. Фагоцитарные реакции в патологии. Первый Российский конгресс по патофизиологии. М.: 1996.
2. Пигаревский В.Е. Гипотеза о резорбтивной клеточной резистентности как особой форме анти-микробной защиты. Архив патологии. 1992; 54 (8): 40-45.
3. Сафронова В.Г., Мальцева В.Н. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли. Цитология. 2009; 469-474.
4. Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abu Abed U. et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoeediting. *Frontiers in immunology*; 2013; 4: 48.
5. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303: 1532-1535.
6. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Издательство РАМН; 2009.
7. Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Кузнецова А.Б., Казачков Е.Л., Шаманова А.Ю., Чиркова Г.Г. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети ДНК сдерживают рост опухолевых клеток. *Российский иммунологический журнал*. 2013; 7(2-3): 130.
8. Balch C. Patterns of human tumor infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch. Surg.* 1990; 125: 200-205.
9. Dolgushin I., Shishkova Y.S., Kuznetsova A.B., Kazachkov E.L., Shamanova A.U., Chirkova G.G. Neutrophil extracellular DNA networks restrain growth of tumor cells. *Internationaler Medizinischer Kongress «Moderne Aspekte der Prophylaxe, behandlung und rehabilitation. Euromedica Hannover*. 2013; 62-63.
10. Семенова А.Б., Шаманова А.Ю., Шишкова Ю.С., Долгушин И.И., Казачков Е.Л., Важенин А.В. Процессы формирования аутологичными нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы молочной железы в зависимости от степени злокачественности и рецепторного статуса опухоли. *Уральский медицинский журнал*. 2014; 08 (122): 29-33.



Рис.5. Распределение элементов воспалительно-клеточного инфильтрата в интраопухолевой зоне инвазивных карцином молочной железы различных молекулярно-генетических типов

Семенова А.Б., Казачков Е.Л., Долгушин И.И., Важеннин А.В.

Формирование нейтрофильными гранулоцитами сетей внеклеточной ДНК как дополнительный диагностический критерий степени злокачественности карцином молочной железы



Рис. 1. Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа высокой степени злокачественности, тройной негативный тип (Ki67 80%) (суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови). Окраска по Романовскому-Гимзе; ок.10 х об. 40.



Рис.2. Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа высокой степени злокачественности, тройной негативный тип (Ki67 80%) с образованием нейтрофильных внеклеточных сетей ДНК (суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови). Окраска – антитела к миелопероксидазе; ок.10 х об.40.

Дуб А. А., Юсупова И. Р.

Роль муцинов и панцитокератинов AE1/AE3 и D2-40 в дифференциальной диагностике атипичной мелкоочаговой пролиферации и аденокарциномы предстательной железы высокой и низкой степени дифференцировки

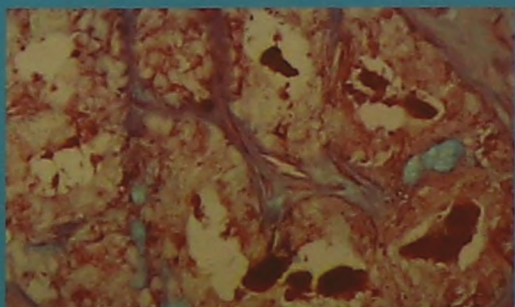


Рис. 1. Муцинообразование в железистом эпителии при доброкачественной эпителиальной гиперплазии предстательной железы. Цитоплазма железистого эпителия содержит гранулы красного-фиолетового цвета, в просвете желез просматривается содержимое голубого цвета. Окраска ШИК-реакция и альциановый синий. × 400

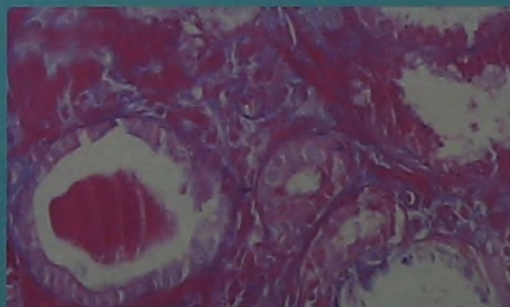


Рис. 2. Муцинообразование при аденокарциноме предстательной железы высокой степени дифференцировки. Цитоплазма атипичных эпителиоцитов содержит гранулы малиново-голубого цвета, наличие в просвете желез секрета красно-фиолетового оттенка. Окраска ШИК-реакция и альциановый синий. × 400