

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

Структурные особенности процессов формирования нейтрофильными гранулоцитами сетей внеклеточной ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы гортани

1 – ГБОУ ВПО ЮУТМУ Минздрава России, г. Челябинск; 2 – ГБУЗ «ЧОКОД», г. Челябинск

Dolgushin I.I., Semenova A.B. Shishkova Y.S., Kazachkov E.L., Vazhenin A.V., Shamanova A.Y.

Structural features of the process of formation of neutrophilic granulocytes networks extracellular DNA at a meeting with larynx carcinoma tumor cells

Резюме

Нейтрофильные гранулоциты, являясь постоянной структурой в микроокружении опухолей, играют неоднозначную роль в онкогенезе. В ответ на микробные и немикробные стимулы нейтрофилы активно формируют во внеклеточном пространстве сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – нейтрофильные внеклеточные ловушки. Нами было замечено, что в ткани опухоли карциномы гортани рядом с опухолевыми клетками диффузно и скоплениями распределяется внеклеточная ДНК.

Ключевые слова: карцинома гортани, нейтрофильные гранулоциты, нейтрофильные внеклеточные сети ДНК

Summary

Neutrophilic granulocytes as a permanent structure in the tumor microenvironment play an ambiguous role in oncogenesis. In response to microbial and non-microbial stimuli neutrophils actively formed in the extracellular space net-like structures composed of nucleic acids and enzymes-neutrophil extracellular trap. We have observed that in tumor tissue near the larynx carcinoma tumor cells spread diffusely and clusters of extracellular DNA.

Keywords: carcinoma of the larynx, neutrophilic granulocytes, neutrophil extracellular DNA network

Введение

Нейтрофильные гранулоциты являются немыми участниками процесса формирования и развития опухоли. По данным литературы, нейтрофилы обладают не только противоопухолевыми свойствами, но и обнаруживают проопухолевые, усиливая ангиогенез и метастазирование [1]. В ответ на микробные и немикробные стимулы нейтрофилы активно формируют во внеклеточном пространстве сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – нейтрофильные внеклеточные ловушки (Neutrophil Extracellular Traps, NETs), способные задерживать и убивать микроорганизмы [2].

В последние годы исследователи стали высказывать осторожные предположения о роли внеклеточных сетей, формирующихся в результате активации нейтрофилов, в воздействии микроокружения на опухолевые клетки [3,4], и более смелые, обозначая внеклеточные сети термином «ловушки», что нейтрофильные внеклеточные ло-

вушки захватывают циркулирующие опухолевые клетки и способствуют метастазированию [5]. В эксперименте нами было показано, что индукция нейтрофилов периферической крови *in vitro* взвесью перевиваемых клеточных линий опухолевых клеток Нер-2, приводит к активации нейтрофилов с формированием внеклеточных сетей, состоящих из нитей дезоксирибонуклеиновой кислоты и бактерицидных гранул [6].

В микропрепаратах и мазках-отпечатках карцином гортани мы обнаружили, что рядом с опухолевыми клетками диффузно и скоплениями распределяется внеклеточная ДНК в виде сетей, предположительно выброшенная вместе с компонентами гранул в ответ на взаимодействие с опухолевыми клетками [7]. Таким образом, было сделано предположение, что нельзя исключить неспецифический характер механизма формирования внеклеточных сетей ДНК в ответ на воздействие опухолевых клеток в эксперименте перевиваемых клеточных

линий опухолевых клеток НЕР-2, равно как и на частицы латекса и микроорганизмы, и, не столь однозначные процессы, происходящие с нейтрофильными гранулоцитами и опухолью *in vivo*. Мы предположили, что нейтрофилы формируют внеклеточные сети ДНК при непосредственной встрече с опухолевыми клетками либо в тканях после миграции их из системы гемомикроциркуляции, либо непосредственно внутри сосудов микроциркуляторного русла.

Цель - уточнение структурных особенностей процессов формирования нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК в ткани опухоли.

Материалы и методы

Материал периферической крови 20 здоровых доноров для анализа забирался одноразовыми инструментами (иглами) в пробирки одноразового использования в день проведения операции у пациентов. 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 фикола-верографина (Phagmacia, Швеция; Шеринг, Германия). Плотность верхнего слоя градиента составляла 1,075-1,077 мл, нижнего - 1,093-1,095 г/мл. Каждый градиент использовали в объеме 1,5 мл. Через 40 минут центрифугирования при 1500 оборотах в минуту на границе между градиентами образовывалось кольцо гранулоцитов с чистотой 98-100%, мононуклеары составляли около 2%, либо отсутствовали. Кольцо нейтрофилов аккуратно собирали, переносили в стерильные центрифужные пробирки, отмывали от градиента стерильным физиологическим раствором хлорида натрия путем центрифугирования при 1500 оборотах в минуту дважды по 5 минут, доводили до концентрации 5×10^6 клеток/мл и использовали для оценки функционального статуса нейтрофилов или получения супернантов.

Забор ткани опухоли гортани у 20 пациентов осуществляли стерильным скальпелем в контейнер одноразового использования в течение 10 минут после операции ларингэктомии. Диагноз был гистологически верифицирован: плоскоклеточная неороговевающая карцинома гортани, умеренной степени дифференцировки. Гортань рассекала в проекции опухоли, и забирался фрагмент на всю толщу образования с окружающей тканью 1,0 см x 0,5 см x 0,2 см. Затем ткань опухоли измельчалась в гомогенизаторе 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 минут, центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 20 минут. После образовавшуюся надосадочную жидкость сливали, осадок отмывали и

доводили разведением стерильным физиологическим раствором хлорида натрия до концентрации $0,5 \times 10^6$ 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 (трипанонегативные клетки) оставалось более 80% клеток, мертвыми оставались менее 20% клеток, которые окрашивались в фиолетовый цвет (трипанопозитивные клетки). Далее полученные взвеси опухолевых клеток каждого пациента группы исследования смешивали в соотношении 1:10 с фракциями нейтрофилов двадцати здоровых доноров. Полученные взвеси инкубировали в термостате при 37°C в течение 60 минут. Затем из полученных взвесей изготавливались мазки на предметных стеклах и окрашивались по Романовскому-Гимзе. Подсчет вели в световом микроскопе с дифференцированием форм лейкоцитов и внеклеточной ДНК на 300 структур (нейтрофилы сегментоядерные, нейтрофилы юные, сети ДНК свободнолежащие, сети ДНК в непосредственном контакте с опухолевыми клетками). При определении функциональной активности нейтрофилов проводили изучение лизосомальной активности, исследуя интенсивность люминесценции лизосом нейтрофилов, прижизненно окрашенных акридиновым оранжевым. Так, 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 (%), а также подсчитывали индекс суммарной люминесценции лизосом (ИСЛЛ), выраженного в условных единицах, с использованием формулы: $ИСЛЛ = Ax1 + Bx3 + Cx10 + Dx0$, где А, В, С, D - количество клеток с заполнением цитоплазмы лизосомальными гранулами на «+», «++», «+++» или с их отсутствием соответственно. При определении активности внутриклеточного кислородзависимого метаболизма проводили постановку НСТ-теста в модификации А.Н. Маянского и М.К. Вискмана (1979). При учете реакции определяли процент НСТ-позитивных клеток и интенсивность реакции по формуле: Интенсивность НСТ = $(Ax3 + Bx2 + Cx1) / 100$, 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 [1].

Учитывали интенсивность спонтанной НСТ-восстанавливающей активности и индуцированной.

Таблица 1. Интенсивность образования нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК при встрече с опухолевыми клетками

	Суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови n=20	Нейтрофилы периферической крови здоровых доноров n=20
Нейтрофилы, юные формы	4,22 ± 0,448 p>0,05	4,22 ± 0,06 p>0,05
Нейтрофилы, зрелые сегментоядерные формы	275,22 ± 3,256 p<0,05	294,13 ± 2,001 p<0,05
Внеклеточные сети	20,56 ± 0,23 p<0,05	1,4 ± 0,011 p<0,05

Таблица 2. Показатели лизосомальной активности нейтрофилов при встрече с опухолевыми клетками

	Показатели лизосомальной активности	
	Активность лизосом, %	Индекс люминесценции лизосом, усл. ед.
Суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови n=20	97,32 ± 1,02 p<0,05	388,12 ± 6,54 p<0,05
Нейтрофилы периферической крови n=20	93,79 ± 1,29	303,81 ± 13,20

Таблица 3. Показатели НСТ-теста при встрече с опухолевыми клетками

Спонтанный НСТ-тест Нейтрофилы периферической крови здоровых доноров Активность, %	Индуктированный НСТ-тест Суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови Активности, %
31,46 ± 3,61 p=0,001 n=20	72,4 ± 4,64 p=0,001 n=20

Результаты и обсуждение

Было показано, что нейтрофилы при встрече с опухолевыми клетками карциномы гортани, так же как и карциномы молочной железы [8], активируются и через 90 минут инкубации выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – нейтрофильные внеклеточные сети ДНК, которые оплетают опухолевые клетки. В то время как в контрольных образцах нейтрофилы не формировали внеклеточных сетей ДНК, сохраняли структуру и жизнеспособность (таб. 1).

Активация нейтрофильных гранулоцитов подтвердилась определением показателя лизосомальной активности и показателя кислородзависимого метаболизма. Количество лизосом в цитоплазме нейтрофилов увеличивалось по сравнению с контрольными пробами, что отражало их функциональную активность и способность к реагированию на внешние воздействия (таб. 2).

Значительно увеличиваются показатели кислородзависимого метаболизма нейтрофилов в опытных образцах (индуцированный НСТ-тест), не изменяясь в контрольных (таб. 3).

Заключение

Нейтрофильные гранулоциты при встрече с атипичными клетками плоскоклеточной неороговевающей карциномы гортани, активируются и начинают формировать

внеклеточные сети ДНК вокруг них, что подтверждается повышением показателей лизосомальной активности и кислородзависимого метаболизма. ■

Долгушин И.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск. Семенова А.Б., к.м.н., заведующая лабораторно-диагностической службой ГБУЗ «ЧОКОД», г. Челябинск. Шишкова Ю.С., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск. Казачков Е.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск. Важенин А.В., д.м.н., профессор, главный врач ГБУЗ «ЧОКОД», заведующий кафедрой онкологии, лучевой диагностики и лучевой терапии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск. Шаманова А.Ю., врач-патологоанатом ГБУЗ «ЧОКОД», аспирант кафедры патологической анатомии и судебной медицины ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск. Автор, ответственный за переписку - Семенова А.Б., 454082, г. Челябинск, ул. Блюхера, 42, заведующая лабораторно-диагностической службой ГБУЗ «ЧОКОД», 8 351 2327855, asemenova81@mail.ru

Литература:

1. Сафронова, В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли / В.Г. Сафронова, В.Н. Мальцева // *Цитология*. – 2009. – С. 469-474.
2. Долгушин, И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева, А.Ю. Савочкина. – М.: Издательство РАМН. 2009. – 208с.
3. Berger-Achituv, S. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting/ S. Berger-Achituv // *Frontiers in immunology*. – 2013. – Vol.4. –P. 48.
4. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann // *Science*. – 2004. – Vol.123(8). – P. 3446–3458.
4. Cools-Lartigue, J. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis / J. Cools-Lartigue, Spicer J., McDonald B. // *J. ClinInvest*. – 2013. – Vol. 123 (8). – P.3446-3458.
5. Долгушин, И. И. Нейтрофильные экстраклеточные сети ДНК сдерживают рост опухолевых клеток / И. И. Долгушин, Ю. С. Шишкова, А. Б. Кузнецова и соавт. // *Российский иммунологический журнал*. – 2013. – Т. 7, 2-3. – с. 130.
6. Dolgushin, I. I. Neutrophil extracellular DNA networks restrain growth of tumor cells. / I. I. Dolgushin, Y. S. Shishkova, A. B. Kuznetsova et al. // *Material of International Medizinischer Kongress «Moderne Aspekte der Prophylaxe, behandlung und rehabilitation».-Euromedica.-Hannover.-2013.-P.62-63.*
7. Shishkova, A. B. Kuznetsova et al. // *Material of International Medizinischer Kongress «Moderne Aspekte der Prophylaxe, behandlung und rehabilitation».-Euromedica.-Hannover.-2013.-P.62-63.*
8. Долгушин, И.И. Функциональная активность нейтрофилов и процессы формирования ими сетей внеклеточной ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы молочной железы / И.И. Долгушин, А.Б. Семенова, Ю.С. Шишкова и соавт. // *Медицинский Вестник Башкортостана*. – 2014. – Т.9, №5. – с. 132-135.