

Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Семенова А.Б., Казачков Е.Л., Важенин А.В.,
Шаманова А.Ю., Димов Г.П.

Взгляд на роль нейтрофильной внеклеточной ДНК, как компонента микроокружения опухоли, в процессах канцерогенеза

ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск, Россия; ГБУЗ «Челябинский областной клинический онкологический диспансер» г. Челябинск, Россия

Dolgushin I.I., Shishkova Y.S., Semenova A.B., Kazachkov E.L., Vagenin A.V., Shamanova A.Y., Dimov G.P.

View on the role of neutrophils extracellular DNA as a component of the microenvironment of tumor in the process of carcinogenesis

Резюме

Одной из важных особенностей злокачественных новообразований является их автономный рост, регулируемый локально продуцируемыми факторами, к которым относят «факторы микроокружения» опухолей, продуцируемые как самими опухолевыми клетками, так и клетками окружающей их стромы. Нейтрофильные гранулоциты, являясь постоянной структурой в «палитре микроокружения» 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 молочной железы рядом с опухолевыми клетками диффузно и скоплениями распределяется внеклеточная ДНК.

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

Summary

One of the important features of malignant neoplasms is their Autonomous growth, adjustable locally produced by factors which include the factors of «microenvironment» tumors, produced by tumor cells and cells in the stroma. Neutrophil granulocytes, being a permanent structure in the palette of the «microenvironment» tumors play a different role in oncogenes. In response to microbial and anmikrobial 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.

Key words: carcinoma of the breast, neutrophils, Neutrophil Extracellular NETs

Введение

Одной из важных особенностей злокачественных новообразований является их автономный рост, регулируемый локально продуцируемыми факторами, к которым относят «факторы микроокружения» опухолей, продуцируемые как самими опухолевыми клетками, так и клетками окружающей их стромы. Продуцируемые эндотелиальными клетками, моноцитами, макрофагами, лимфоцитами и тучными клетками интерлейкины, простагландины, регуляторные пептиды прямо или косвенно влияют на пролиферацию и индуцированную гибель опухолевых клеток [1].

Нейтрофильные гранулоциты, являясь постоянной структурой в «палитре микроокружения» опухолей играют неоднозначную роль в онкогенезе. Нейтрофилы являются неизменными участниками процесса формирова-

ния и развития опухоли. Показано, что нейтрофилы на 10 сутки после инокуляции опухолевых клеток активно мигрируют к опухоли, инфильтрируют ее строму и становятся активными компонентами стромы.

По данным литературы, нейтрофилы обладают не только противоопухолевыми свойствами, но и обнаруживают проопухолевую [1], усиливая ангиогенез и метастазирование, в том числе и за счет продукции активных форм кислорода.

Показано, что 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 [4].

В последние годы исследователи стали высказывать осторожные предположения о роли внеклеточных сетей, формирующихся в результате активации нейтрофилов, в воздействии микроокружения на опухолевые клетки [5] и более смелые, обозначая внеклеточные сети термином «ловушки», что нейтрофильные внеклеточные ловушки захватывают циркулирующие опухолевые клетки и способствуют метастазированию [6].

Нами было замечено, что в ткани опухоли карциномы молочной железы рядом с опухолевыми клетками диффузно и скоплениями распределяется внеклеточная ДНК [7].

Было сделано предположение, что нейтрофилы, взаимодействуя с опухолевыми клетками, выбрасывают собственную ДНК и компоненты гранул, образуя внеклеточные сети, которые могут оказывать действие на пролиферацию опухолей, ангиогенез и метастазирование.

В эксперименте нами было показано, что индукция нейтрофилов периферической крови *in vitro* взвесью взвеси перевиваемых клеточных линий опухолевых клеток НЕР-2, RD приводит к активации нейтрофилов с формированием внеклеточных сетей, состоящих из нитей дезоксирибонуклеиновой кислоты и бактерицидных гранул [8, 9].

В дальнейшем мы высказали предположение, что нельзя исключить неспецифический характер механизма формирования внеклеточных сетей ДНК в ответ на воздействие опухолевых клеток в эксперименте, равно как и на частицы латекса и микроорганизмы, и, совершенно иные, или, по крайней мере, не столь однозначные процессы, происходящие с нейтрофилами и опухолевыми клетками одного индивидуума. Мы предположили, что формируя внеклеточные сети ДНК на клетки опухолевых культур, нейтрофилы могут не образовывать их на «собственные» опухолевые клетки.

Уточнение понимания процессов специфичности формирования нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК в ткани опухоли явилось *целью* нашего исследования.

Материалы и методы

Взятие материала периферической крови 20 здоровых доноров и 20 пациентов с опухолями молочной железы для анализа производилось одноразовыми инструментами (иглами) в пробирки одноразового использования в 8.00 часов утра в день проведения операции у пациентов. В связи с тем, что в течение одного дня мы могли забрать материал опухоли у четырех пациенток, эксперимент проводился в течение 5 дней. Кровь 20 здоровых доноров забиралась ежедневно.

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). Плотность верхнего слоя градиента составляет 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 оборо-

тах в минуту на границе между градиентами образуется кольцо гранулоцитов с чистотой 98-100%, мононуклеары составляют около 2%, либо отсутствуют. Кольцо нейтрофилов аккуратно собирают, переносят в стерильные центрифужные пробирки, отмывают от градиента стерильным физиологическим раствором хлорида натрия путём центрифугирования при 1500 оборотах в минуту дважды по 5 минут, доводят до концентрации 5×10^6 клеток/мл и используют для оценки функционального статуса нейтрофилов или получения супернатантов.

Забор ткани опухоли молочных желез у 20 пациентов осуществляли стерильным скальпелем в контейнер одноразового использования в течение 10 мин после радикальной мастэктомии по Маддену или Пэйти. Диагноз был ранее гистологически верифицирован по результатам трепанобиопсии опухоли: инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, умеренной степени злокачественности (G2), лиминальный тип В, Нег негативный. Молочная железа рассекалась в проекции опухоли, и забирался фрагмент с периферии узлового образования с окружающей тканью $0,5 \text{ см} \times 0,5 \text{ см} \times 0,2 \text{ см}$. После 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° в течение 30 мин, центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 20 мин. После образовавшуюся надосадочную жидкость сливали и 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 и фракцией собственных нейтрофилов периферической крови. Полученные взвеси инкубировали в термостате при 37°С в течение 60 мин.

После из полученных взвесей изготавливались мазки на предметных стеклах и окрашивались по Романовскому-Гимзе с микроскопией в световом микроскопе 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).

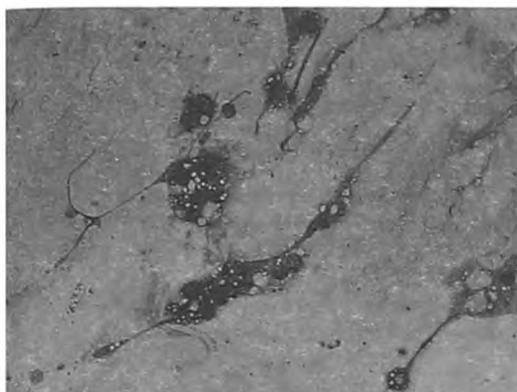


Фото 1. Нейтрофильные внеклеточные сети ДНК в непосредственном контакте с опухолевыми клетками карциномы молочной железы. Окрашивание по Романовскому –Гимзе (ув.10х100)

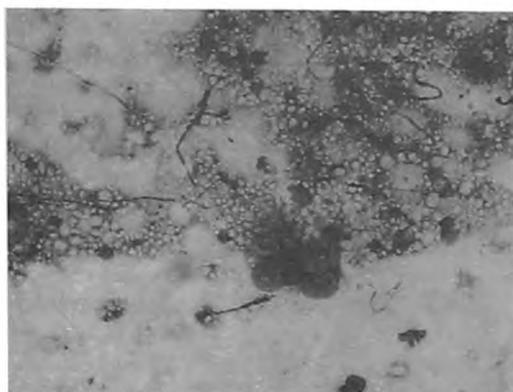


Фото 2. Нейтрофильные внеклеточные сети ДНК, лежащие свободно и в контакте с опухолевыми клетками карциномы молочной железы. Окрашивание по Романовскому –Гимзе (ув.10х40)

Таблица 1. Сравнительная характеристика фракций собственных, донорских гранулоцитов и интенсивности образования ими внеклеточных сетей ДНК

	Суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови пациента	Суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови донора
Нейтрофилы, юные формы	3,63 ± 0,418 p>0,05	3,98 ± 0,526 p>0,05
Нейтрофилы зрелые, сегментоядерные формы	271,62 ± 2,06 p=0,026	278,75 ± 2,006 p=0,026
Внеклеточные сети ДНК, лежащие свободно	19,7 ± 0,44 p<0,001	15,1 ± 0,31 p<0,001
Внеклеточные сети ДНК, оплетающие опухолевые клетки	5,05 ± 0,25 p<0,001	2,17 ± 0,17 p<0,001

Результаты и обсуждение

Нами вынесено предположение: формируя внеклеточные сети ДНК на клетки перевиваемых клеточных линий HER-2, RD, нейтрофилы могут не образовывать их на «собственные» опухолевые клетки. Но по результатам исследования собственные нейтрофилы более активно формировали сети вблизи опухолевых клеток, по сравнению с нейтрофилами здоровых доноров (таблица №1). Кроме того нейтрофилы пациента в большем количестве формировали сети вокруг собственных опухолевых клеток.

Заключение

Таким образом подтверждается, что механизм образования нейтрофильных сетей ДНК обладает определенной специфичностью, что возможно связано с эффектом

предактизации «премирования» нейтрофилов собственными опухолевыми клетками. ■

Долгушин Илья Ильич, ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Шишкова Юлия Сергеевна, ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Семенова А.Б., ГБУЗ «Челябинский областной клинический онкологический диспансер» г.Челябинск; Казачков Е.Л. ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Вазжинин А.В., ГБУЗ «Челябинский областной клинический онкологический диспансер» г.Челябинск; Шаманова А.Ю., ГБУЗ «Челябинский областной клинический онкологический диспансер» г.Челябинск; Димов Г.П., ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку - Семенова А.Б. 454082, г.Челябинск, ул. Блюхера 42, . 89226987221; 8 351 2327855, kuznetsova_anna@mail.ru

Литература:

- Сафронова В.Г., Мальцева В.Н. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли. // Цитология. 2009. С.469-474.
- Пигаревский, В.Е. Гипотеза о резорбтивной клеточной резистентности как особой форме антимикробной защиты организма // Арх. патологии. – 1992. – Т. 54, Вып. 8 – С. 40-45.
- Маянский, Д.Н., Цырендоржиев, А.А., Зубахина Д.Д. Фагоцитарные реакции в патологии // Первый Российский конгресс по патофизиологии. – М., 1996. – С. 269.
- Brinkmann V., Rechart U., Goosmann C. et al.

- Neutrophil extracellulartraps kill bacteria // Science. – 2004. – Vol. 303. – P. 1532–1535.
5. Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abed U.A. et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting // *Frontiers in immunology*. March 2013. V.4. Article 48
 6. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B. et al Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis // *J Clin Invest* 2013;123(8):3446–3458).
 7. Dolgushin I.I. et al. Neutrophil extracellular DNA networks restrain growth of tumor cells, Internationaler Medizinischer Kongress «Moderne Aspekte der Prophylaxe,behandlung und rehabilitation» euromedica Hannover, 2013, p.62-63.
 8. Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Кузнецова А.Б и др. «Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети ДНК сдерживают рост опухолевых клеток», *Российский иммунологический журнал*, том 7, и2-3, с 130, 2013
 9. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов // М.: Издательство РАМН. 2009. 208 с.