

ОБРАЗОВАНИЕ НЕТ-ЛОВУШЕК И АКТИВНОСТЬ СЕКРЕТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*Белевич Е. И.¹, Готько О. В.¹, Прохорова В. И.¹, Таганович А. Д.², Ковганко Н. Н.²,
Колб А. В.², Хотько Е. А.²*

*¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и
медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»,*

Минский р-н, аг. Лесной, Республика Беларусь

*²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Изучена возможность использования способности нейтрофилов формировать НЕТ-ловушки и секретировать ферменты для диагностики рака молочной железы (РМЖ). Установлено, что у пациентов с РМЖ увеличена интенсивность образования НЕТ-ловушек относительно группы здоровых людей. Имеется статистически значимое увеличение активности секреторных ферментов нейтрофилов – миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы в случае пациентов с РМЖ по сравнению со здоровыми людьми.

Ключевые слова: рак молочной железы, диагностика, нейтрофил, НЕТ-ловушка, миелопероксидаза, эластаза.

Введение. В Республике Беларусь по данным Белорусского канцер-регистра РМЖ занимает первое место по заболеваемости злокачественными новообразованиями у женщин (22,3 %) со средним приростом за 10 лет в 26,2 % [1]. В последние десятилетия комплексный

подход стал стандартом лечения РМЖ. Критериями эффективности медицинской помощи в данном случае служат ответ опухоли на терапию, частота рецидивирования и прогрессирования заболевания после завершения лечения. При соблюдении такого подхода показатель пятилетней

кумулятивной скорректированной выживаемости пациентов всех стадий РМЖ составляет 80,9 %. Однако, несмотря на успехи в лечении пациентов с данной патологией, у около 50 % женщин в течение 5 лет развивается рецидив или наблюдается прогрессирование заболевания, что свидетельствует о наличии ряда нерешенных проблем, связанных с оптимизацией выявления резистентности к специальному противоопухолевому лечению и прогнозированием возврата заболевания [2]. Прогнозирование, раннее выявление и своевременное лечение резистентных, рецидивирующих и метастатических форм РМЖ является значительным резервом улучшения общих результатов лечения.

Корректный выбор до- и послеоперационной терапии, оценка прогноза и вероятности рецидива могут основываться на исследовании прогностических и предиктивных факторов. Помимо давно предложенных клинических критериев, позволяющих планировать лечение и прогнозировать течение РМЖ, таких как возраст пациентов, размер опухоли, состояние периферических лимфатических узлов, гистологический тип опухоли, степень злокачественности, гормоно-рецепторный статус, на данный момент не существует четких лабораторных факторов прогноза непосредственных и отдаленных результатов лечения РМЖ, в связи с чем исследователи всего мира продолжают их поиски [3].

Нейтрофилы опухоли могут проявлять проопухолевую активность, способствуя усилению ангиогенеза и потенцируя процессы метастазирования [4–6]. Имеются сведения, что воспалительные цитокины, высвобождаемые опухолью для привлечения нейтрофилов, праймируют клетки и способствуют их дальнейшему нетозу [7]. Показано, что NETs содействуют прогрессированию [2, 3] и метастазированию опухоли [4]. В других исследованиях активным формам кислорода, азота, галогенов и некоторым цитокинам, продуцируемым этими клетками [5], отводят ключевую роль в регрессии опухолевого процесса, что говорит о противоопухолевой активности нейтрофилов.

Анализ доступной литературы свидетельствует о влиянии иммунных клеток как микроокружения опухоли, так и периферической крови, в том числе их морфофункциональных характеристик, на процессы канцерогенеза, лекарственной устойчивости и опухолевой прогрессии при злокачественных новообразованиях различных локализаций. Однако в настоящее время роль данных показателей при оценке химиорезистентности и прогрессирования РМЖ противоречива и

не полностью изучена в связи с гетерогенностью заболевания.

Цель работы – определить диагностическую информативность способности нейтрофилов к образованию NET-ловушек и активности их секреторных ферментов при РМЖ.

Материалы и методы. Все изучаемые показатели определены в группе клинически здоровых женщин (группа КЗЖ – 25 человек) и пациентов с РМЖ до начала лечения (60 человек). Клинико-морфологические характеристики пациентов, включенных в исследование, представлены в таблице 1. Сопоставлены уровни лабораторных показателей у клинически здоровых женщин и онкологических пациенток с РМЖ до начала лечения.

Таблица 1 – Характеристика пациентов с РМЖ, включенных в исследование

Параметр	Значение
Количество пациенток, всего	60
Возраст, лет ($S \pm \sigma$)	58,8 $\pm$ 12,3
Пол, м/ж	0/60
Стадия:	
– I	17 (28,3 %)
– II	29 (48,4 %)
– III	8 (13,3 %)
– IV	3 (5,0 %)
– Не определена	3 (5,0 %)
Распространенность опухолевого процесса:	
– T1	22 (36,7 %)
– T2	28 (46,7 %)
– T3	1 (1,6 %)
– T4	9 (15,0 %)
Поражение регионарных лимфатических узлов:	
– N0	34 (56,7 %)
– N1	28 (46,7 %)
– N2	2 (3,3 %)
– N3	5 (8,3 %)
Отдаленное метастазирование:	
– M0	56 (93,3 %)
– M1	4 (6,7 %)
Степень дифференцировки опухоли:	
– GI	5 (8,3 %)
– GII	39 (65,0 %)
– GIII	10 (16,7 %)
– Не определена	6 (10,0 %)

Окончание табл. 1

Локализация:	
– правая молочная железа	27(45,0 %)
– левая молочная железа	33 (55,0 %)
Гистологическая форма:	
– инвазивная карцинома	58 (96,6 %)
– метастатическая плоскоклеточная карцинома	1 (1,7 %)
– муцинозная карцинома	1 (1,7 %)
Молекулярно-биологический тип:	
– люминальный А	29 (48,3 %)
– люминальный В Her2-	15 (25,0 %)
– люминальный В Her2+	9 (15,0 %)
– Her2+-позитивный (не люминальный)	1 (1,7 %)
– триплетнегативный (ТН)	6 (10,0 %)

Выделение фракции нейтрофилов периферической крови осуществляли методом разделительного центрифугирования. Венозную кровь насаивали на градиент плотности Histopaque-1119 и Histopaque-1077 в пробирках Falcon объемом 15 мл и центрифугировали (700 g, 30 минут, 25 °С). Плазматические и мононуклеарные клетки отделяли, а слой, содержащий гранулоциты, переносили в отдельную пробирку и отмывали в 100 мл 155 мМ раствора NaCl (270 g, 10 минут, 25 °С). Оставшуюся примесь эритроцитов лизировали с использованием раствора NH₄Cl (0,83 %, pH 7,2) в течение 5 минут при 37 °С. Выделенные нейтрофилы отмывали в 100 мл 155 мМ раствора NaCl (270 g, 10 минут, 25 °С) и ресуспендировали в 1 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса – HBSS (pH 7,2) с добавлением 0,1 % желатина (мас./об.). Клеточные препараты содержали 80–90 % нейтрофилов с жизнеспособностью выше 95 % (тест с трипановым синим).

Определение уровня citH3 в плазме крови пациентов основной и контрольной групп осуществляли с использованием иммуноферментного анализа (Citrullinated Histone H3 ELISA Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, США).

Дополнительно анализировали уровень внеклеточной двухцепочечной ДНК. Для этого нейтрофилы (1 × 10⁶ клеток/мл) инкубировали с гелем HBSS (контроль) и затем стимулировали форбол-12-миристан-13-ацетатом (1 × 10^{–7} моль/л) в течение 4 часов при 37 °С. Двойные нити ДНК количественно определяли флуориметрическим методом с помощью набора для анализа двухцепочечной ДНК «Quant-iT PicoGreen» (Termo Fisher Scientific, США) в соответствии с

рекомендациями производителя. Интенсивность флуоресценции исследуемых образцов измеряли на микропланшетном флуориметре (Bio-Rad Lab) при длинах волн возбуждения/испускания 502 нм и 523 нм соответственно.

Активность миелопероксидазы нейтрофилов (2 × 10⁶ клеток/мл) определяли через реакцию образования хлорноватистой кислоты, которая затем реагировала с таурином с образованием хлорамина таурина. Хлорамин таурина после взаимодействия с 5-тио-2-нитробензойной кислотой (ТНБ) образовывал бесцветный продукт – 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойную кислоту. Одна единица активности МПО определялась как количество фермента, который гидролизует субстрат и образует таурин-хлорамин для потребления 1,0 мкМ ТНБ в минуту при 25 °С.

Определение проводили путем измерения оптической плотности образца при 450 нм с использованием микропланшетного фотометра (Bio-Rad Lab).

Активность нейтрофильной эластазы анализировали после обработки суспензии нейтрофилов (2 × 10⁶ клеток/мл) N-формилметионил-лейцилфенилаланином (fMLP; 1 × 10^{–7} моль/л, 100 мл) в течение 30 минут при 37 °С. Через 30 минут измеряли оптическую плотность образовавшегося п-нитроанилина при 405 нм с использованием микропланшетного фотометра (Bio-Rad Lab).

Статистическую значимость различий оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (U-test) в программе STATISTICA 10.0.

Различия считали статистически значимыми при уровне значимости <0,05.

Результаты и их обсуждение. В таблице 2 представлены результаты изученных лабораторных показателей обследованных пациенток и здоровых людей. Выявлены значимые различия (p=0,037) содержания гиперцитруллированного гистона citH3 в крови пациентов, страдающих РМЖ, и группой КЗЖ (0,746 и 0,326 нг/мл соответственно).

У 95 % пациенток группы РМЖ содержание citH3 в плазме крови колебалось от 0,361 до 0,859 нг/мл, а у 95 % лиц в группе КЗЖ – от 0,281 до 0,371 нг/мл.

Дополнительным критерием, подтверждающим повышенную способность нейтрофилов пациенток с РМЖ к формированию NET-ловушек, является уровень внеклеточной ДНК, который оказался выше по сравнению с группой КЗЖ (таблица 2).

Таблица 2 – Уровни маркеров NET-ловушек и активности секреторных белков нейтрофилов в крови пациенток при РМЖ и здоровых женщин

Показатель	Группа КЗЖ	Группа РМЖ	p
Цитруллированный гистон H3 (citH3), нг/мл	0,326 [0,281; 0,371]	0,746 [0,361; 0,859]	0,037
Внеклеточная ДНК, нг/мл	147,1 [111,3; 168,2]	193,7 [163,6; 223,5]	0,022
Активность миелопероксидазы, мU/мл	3,9 [1,5; 5,5]	7,1 [2,9; 9,3]	0,008
Активность нейтрофильной эластазы, мU/мл	2,7 [1,1; 3,9]	4,9 [2,8; 6,3]	0,012

Проведенный анализ показателей активности секреторных ферментов нейтрофилов – миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы показал статистически значимое увеличение уровня активности указанных выше ферментов у пациенток при РМЖ относительно здоровых женщин (таблица 2).

Заключение. Исследование функциональной активности нейтрофилов периферической крови у пациенток при РМЖ выявило значимое увеличение способности нейтрофилов к образованию NET-ловушек относительно группы клинически здоровых женщин. Показано значимое увеличение активности секреторных ферментов нейтрофилов – миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы у пациенток при РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами. Полученные результаты свидетельствуют об информативности изученных показателей.

Список цитированных источников

1. Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных Белорусского канцер-регистра за 2010–2019 гг. / А. Е. Океанов [и др.] ; под ред. С. Л. Полякова. – Минск : РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова, 2020. – 298 с.
2. Особенности диагностики и клинического течения разных иммуногистохимических подтипов рака молочной железы / М. Х. Ель Хажж [и др.] // Клінічна медицина. – 2014. – Т. 19, № 14. – С. 29–35.
3. Современные стандарты лечения больных первичным раком молочной железы (по материалам Международной конференции «Рак молочной железы», Москва, 22–24 января 2014 г.) / В. П. Летягин [и др.] // Опухоли женской репродукт. системы. – 2014. – № 1. – С. 21–31.
4. Связь иммунологических показателей с эффективностью неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы / Я. В. Кухарев [и др.] // Сибирский онкологический журнал – 2013. – № 2 (56). – С. 50–57.
5. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration / Q. D. Wu [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2001. – Vol. 280, № 4. – P. 814–822.
6. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты: обзор / И. В. Нестерова [и др.] // Иммунология. – 2011. – Т. 33, № 5. – С. 281–287.
7. Gradient infiltration of neutrophil extracellular traps in colon cancer and evidence for their involvement in tumour growth / S. Arelaki [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N 5.

Formation of NET traps and activity of secretory enzymes of neutrophils in breast cancer

Bialevich K. I.¹, Gotko O. V.¹, Prokhorova V. I.¹, Tahanovich A. D.², Kauhanka M. M.², Kolb A. V.², Khotko E. A.²

¹N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus,
Minsk District, Lesnoy, Republic of Belarus;

² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The possibility of using the ability of neutrophils to form NET traps and secrete enzymes for the diagnosis of breast cancer was studied. It was found that in patients with breast cancer the intensity of NET trap formation is increased relative to the group of healthy people. Analysis of the activity of neutrophil secretory

enzymes – myeloperoxidase and neutrophil elastase – showed a statistically significant increase in patients with breast cancer compared to healthy people.

Keywords: breast cancer, diagnosis, neutrophil, NET trap, myeloperoxidase, neutrophil elastase.

Принята 05.06.2024