

ФЕНОТИП НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НА НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ РАКА ТЕЛА МАТКИ

© Т. В. Абакумова,¹ И. И. Антонеева, Т. П. Генинг,
Д. Р. Долгова, С. О. Генинг

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, 432017;

¹ электронный адрес: taty-abakumova@yandex.ru

Исследовали нейтрофилы периферической крови 123 первичных больных раком тела матки на стадии Ia. Оценивали следующие показатели: рецепторный аппарат и способность образования внеклеточных ловушек (NET-активность) методом флуоресцентной микроскопии, спонтанную продукцию цитокинов IL-2, IFN- γ , G-CSF, матриксных металлопротеиназ (ММП) 1, 9 и 13 методом твердофазного иммуноферментного анализа, фагоцитарную активность, активность миелопероксидазы, уровень катионных белков, активность нейтрофилов в спонтанном НСТ-тесте, позволяющем оценить кислородозависимую бактерицидность нейтрофилов. Топологию и ригидность мембраны нейтрофилов оценивали с помощью сканирующей зондовой микроскопии. Показали, что при увеличении относительного количества нейтрофилов изменяется их рецепторный аппарат, усиливаются аэробная и анаэробная цитотоксичность и способность к фагоцитозу при одновременном снижении NET-активности. Наблюдали изменение секреторной активности нейтрофилов, которое характеризовалось повышением уровня ММП-1, что, возможно, инициируется усиленной продукцией активных форм кислорода, снижением уровня индуктора цитотоксической активности IL-2 и резким возрастанием уровня G-CSF, стимулирующего гемопоэз. Архитектоника нейтрофилов на стадии Ia рака тела матки характеризуется изменением формы и утратой зернистости. Жесткость клеточной мембраны снижалась. Изменение морфологии нейтрофилов на фоне сохраняющейся гиперактивности позволяет предполагать состояние равновесия между иммунной системой и опухолью уже на клинической стадии Ia рака тела матки.

Ключевые слова: периферические нейтрофилы, рак тела матки.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ИЗФ — индекс завершенности фагоцитоза, ММП — матриксные металлопротеиназы, МПО — миелопероксидаза, НСТ — нитросиний тетразолий, РТМ — рак тела матки, СЦК — средний цитохимический коэффициент, G-CSF — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, IFN — интерферон, IL — интерлейкин, NET — нейтрофильные внеклеточные ловушки.

Рак тела матки (РТМ) занимает 6-е место в структуре заболеваемости злокачественными опухолями женщин в мире (Ferlay et al., 2013) и 1-е место в структуре онкогинекологической патологии в России (Давыдов, Аксель, 2014). Более чем у 70 % больных РТМ заболевание диагностируется на I стадии (Бахман, 2002), однако смертность от этой патологии составляет 4.6 % (Писарева и др., 2007). Роль неспецифического иммунитета вообще и нейтрофилов в частности в динамике канцерогенеза в настоящее время представляется достаточно спорной. С одной стороны, накопленные данные доказывают активное проопухолевое участие нейтрофилов в патофизиологии рака и опухолевой прогрессии. Это стимуляция неоангиогенеза (Kuang et al., 2011), миграции (инвазии) опухоли (Dumitru et al., 2011), подавление функции Т-клеток (Rotondo et al., 2009). В то же время нейтрофилы могут быть потенциальными противоопухолевыми эффекторными клетками. Антимикробное и цитотоксическое содержимое их гранул может использоваться для уничтожения неоплазмы. Секретируемые нейтрофилами цитокины и хемокины могут активировать другие эффек-

торные противоопухолевые клетки (Borregaard et al., 2007). К настоящему времени показано существование двух различных популяций опухолеассоциированных нейтрофилов с противоопухолевой (N1) и проопухолевой (N2) активностью (Fridlender et al., 2009). Считается, что фенотип опухолеассоциированных нейтрофилов зависит от микроокружения опухоли. Сложнее интерпретировать формирование фенотипа нейтрофилов периферической крови. Показано, что при патологических состояниях вообще и при возникновении и развитии в организме злокачественной солидной опухоли в частности происходит трансформация фенотипа нейтрофилов (Антонеева, Генинг, 2007; Нестерова и др., 2011). Данные литературы и результаты наших исследований (Антонеева, Генинг, 2007; Klink et al., 2008) позволяют предполагать модифицирующее влияние неоплазмы на нейтрофилы. Конечный эффект при этом зависит от типа опухоли, места локализации и стадии ее развития.

Цель настоящей работы заключалась в характеристике фенотипа нейтрофилов периферической крови на начальной стадии РТМ.

Материал и методика

Обследуемая группа состояла из 123 первичных больных РТМ стадии Ia (по международной классификации FIGO). Контрольную группу составили практически здоровые женщины. Для приготовления лизата нейтрофилов клетки выделяли из 5 мл гепаринизированной крови в двойном градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1.117$ и 1.077 г/мл). Взвесь нейтрофилов трижды отмывали физиологическим раствором. Чистота фракции нейтрофилов составляла 92—94 %. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0.5%-ным трипановым синим составляла 95 %. Выделенные и отмыемые нейтрофилы помещали в 0.15 мл физиологического раствора (по 50 ± 5 тыс. клеток) и получали лизаты путем замораживания—оттаивания. Спонтанную продукцию цитокинов IL-2, IFN- γ и G-CSF (ЗАО Вектор-Бест-Волга, Нижний Новгород) и активных форм матриксных металлопротеиназ ММП-1 (BCM Diagnostics, США), ММП-9 (Quantikine, R&D Systems, США) и ММП-13 (BenderMedSystems, США) определяли твердофазным иммуноферментным методом. Лизаты нейтрофилов хранили в течение 1 мес при -25 °С. Для оценки фагоцитарной активности нейтрофилов рассчитывали фагоцитарный индекс по Гамбургеру, фагоцитарное число (ФЧ) по Райту и индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) (Рудик, 2006). Цитохимически в нейтрофилах определяли активность миелопероксидазы (МПО) по методу Грэхема—Кнолля с бензидином (He et al., 2012), уровень катионных белков — по методу Шубича с бромфеноловым синим (Schmidt et al., 2005), долю активных нейтрофилов — в спонтанном варианте с восстановлением нитросинего тетразолия в нерастворимый диформаза (НСТ-тест) (Kuang et al., 2011). Результаты каждого определения выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК) (Dumitru, 2011).

Для определения нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET — neutrophil extracellular traps) — сетеподобных структур, состоящих из нуклеиновых кислот и ферментов (Долгушин и др., 2014), — нейтрофилы, выделенные из периферической крови, окрашивали с помощью 0.04%-ного раствора акридинового оранжевого. Полученные результаты оценивали на флуоресцентном микроскопе, используя при этом фильтры, которые обеспечивают возбуждающий свет с длиной волны не более 490 нм и эмиссию с длиной волны 520 нм. Высчитывали долю NET (количество нейтрофильных ловушек, содержащих дрожжевые клетки, в 100 подсчитанных сетеподобных структурах, %) и индекс нейтрофильной ловушки (число дрожжевых клеток в 100 подсчитанных ловушках в пересчете на 1 структуру).

Имунофенотипирование нейтрофилов проводили на флуоресцентном микроскопе NikonNi-U с использованием моноклональных антител (МКА) к поверхностным антигенам CD11b, CD16, CD63 и CD95 (ЗАО «Сорбент», Москва). Для оценки топологии и ригидности мембраны нейтрофилов использовали атомно-силовую микроскопию (SolverPro, NT-MDT, Россия). Использовали фирменные кремниевые зонды с жесткостью 0.2 Н/м, радиус закругления кончика зонда составлял примерно 50 нм. Нейтрофилы сканировали в жидкой среде в чашке Петри. Ригидность мембран оценивали по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца (Плескова и др., 2006).

При статистической обработке результатов центральной характеристикой служила медиана, а при сравнении

данных использовали непараметрический критерий Манна—Уитни и коэффициент корреляции по Спирмену. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

Проведенная работа показала возрастание относительного количества нейтрофилов (60.6 ± 3.0 против 53.4 ± 1.7 в контроле, $p = 0.0512$) в периферической крови больных РТМ на стадии Ia. В ряде исследований отмечено, что прогрессия рака сопровождается увеличением количества нейтрофилов в периферической крови (Schmidt et al., 2005; Halazun et al., 2009; He et al., 2012). Возможно, это является следствием опухолемедиаторного гранулоцитопоза и поддерживает проопухолевый эффект воспаления, ассоциированного с раком. Первые сообщения о противоопухолевой активности нейтрофилов появились в 1972 г. (Pickaver et al., 1972). В везикулах нейтрофилов хранятся медиаторы, выполняющие роль антимикробных эффекторных молекул, которые при определенных условиях могут проявлять цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток (Dallegrì et al., 1991). Гранулы и секреторные везикулы также содержат белки, которые при экзоцитозе встраиваются в мембрану нейтрофилов. Три типа везикул — азурофильные (специфические), желатиновые и секреторные везикулы — при активации выбрасывают содержимое либо во внеклеточное пространство при образовании внеклеточных нейтрофильных ловушек, либо в фагоцитарные вакуоли. Резервные мембранные белки при этом встраиваются в клеточную мембрану. Продукты гранул помимо цитолитического действия влияют на функциональную активность как самих нейтрофилов, так и других клеток.

Мы показали, что у больных РТМ значимо повышается активность МПО нейтрофилов, определяющая их киллерную функцию, СЦК которой составлял 2.72 ± 0.07 против 1.56 ± 0.16 в контроле ($p = 0.0124$). Кроме того, повышенной по сравнению с контролем была и доля нейтрофилов, активных в спонтанном НСТ-тесте, составляющая 2.02 ± 0.22 против 1.06 ± 0.17 отн. ед. в контроле ($p = 0.0051$); уровень катионных белков тоже повышался, и их СЦК составлял 1.74 ± 0.09 против 0.92 ± 0.14 в контроле ($p = 0.0175$). Повышение количества этих потенциально цитотоксических медиаторов может свидетельствовать о праймировании нейтрофилов. Результатом такого праймирования может быть нормальный киллинг микроорганизмов либо — при избыточной генерации активных радикалов — повреждение окружающих тканей и клеток иммунной системы (De Oliveira-Junior et al., 2011).

Одной из основных функций нейтрофилов является фагоцитоз. Мы показали незначительное увеличение фагоцитарного индекса (49.2 ± 4.75 против 41.2 ± 6.43 в контроле, $p = 0.0614$) и уменьшение фагоцитарного числа (1.67 ± 0.17 против 2.06 ± 0.22 в контроле, $p = 0.0667$) нейтрофилов больных РТМ.

В качестве альтернативы фагоцитозу сегодня рассматриваются NET. Это сетеподобные структуры, выбрасываемые нейтрофилами после активации во внеклеточное пространство. В состав этих структур входят ДНК, гистоны, белки и ферменты гранул (Brinkmann et al., 2004). Посредством NET нейтрофилы уничтожают или ограничивают распространение патогена. Существует мнение, что формирование нейтрофилами NET является

важным механизмом врожденного иммунного ответа, при котором нейтрофилы защищают организм от основных инфекционных патогенов (Нестерова и др., 2011). Относительно неопластически измененных клеток постулируется проопухолевая роль NET (Cools-Lartigue et al., 2013; Sangaletti et al., 2014). Мы показали снижение способности формирования NET нейтрофилами больных РТМ на стадии заболевания Ia: число NET составило 17.55 ± 2.48 против 24.25 ± 3.40 в контроле ($p = 0.0501$), а индекс NET — 0.23 ± 0.06 против 0.39 ± 0.02 в контроле ($p = 0.0225$).

В настоящее время установлено существование различных субпопуляций нейтрофилов, обладающих различными возможностями (Нестерова и др., 2011). Под влиянием цитокинов нейтрофилы проходят различные стадии активации и дифференцировки, экспрессируя при этом различные поверхностные рецепторы. Эти поверхностные молекулы не только являются маркерами нейтрофилов, но и определяют особенности активации и эффекторной функции этих клеток. Экспрессируемые на нейтрофилах рецепторы проводят сигналы, запускающие внутриклеточные каскадные реакции, в ходе которых активируются продукция активных радикалов, образование NET, процессы фагоцитоза, адгезии, а также продукция цитокинов. В нейтрофилах больных РТМ нами обнаружено значимое возрастание экспрессии CD11b (38.25 ± 4.97 против 29.11 ± 4.16 в контроле, $p = 0.02971$). CD11b — рецептор адгезии и рецептор комплемента, связывающий компонент C3 комплемента. Показано ранее, что активация медирированной цитотоксичности (Fc) возможна только после активации рецепторов адгезии CD11b во время формирования иммунологического синапса (Нестерова и др., 2012). В то же время экспрессия низкоаффинного рецептора CD16 на нейтрофилах больных РТМ, по нашим данным, сохранялась в пределах коридора нормы (47.12 ± 1.10 против 49.50 ± 0.40 в контроле, $p = 0.1271$). Рецептор CD16 отвечает за цитотоксическую функцию нейтрофилов. Существует мнение, что экспрессия CD16 равномерно нарастает по мере созревания нейтрофилов и что более высокой экспрессией этого рецептора обладают клетки с повышенной функциональной активностью (Нестерова и др., 2012). Нами выявлено значимое возрастание экспрессии CD63, маркера азурофильных гранул (26.75 ± 3.21 против 14.50 ± 2.44 в контроле, $p = 0.0326$), которое коррелирует с повышением активности МПО ($r = 0.65$, $p = 0.04$).

CD95 (мембранный рецептор Fas-лиганда из семейства рецепторов фактора некроза опухолей) характеризуется как центральный физиологический регулятор апоптоза. Экспрессия CD95 нейтрофилами представляет особый интерес, поскольку только они чувствительны к Fas-опосредованному апоптозу. Мы показали значимое повышение экспрессии CD95 нейтрофилами больных РТМ (37.00 ± 5.76 против 17.20 ± 2.53 % в контроле, $p = 0.0103$). Наблюдаемая динамика укладывается в существующее представление о том, что нормально функционирующие нейтрофилы при контакте с патогеном реализуют ранний стереотипный адекватный ответ, выражающийся в активации рецепторного аппарата, повышении фагоцитарной активности и активности микробцидных компонентов гранул (Нестерова и др., 2011).

Нейтрофилы являются участниками формирования «цитокиновой сети», секретируя ряд цитокинов. Мы обнаружили выраженное снижение количества индуктора цитотоксической активности IL-2 (5.17 — 36.45 ($19.26 \pm$

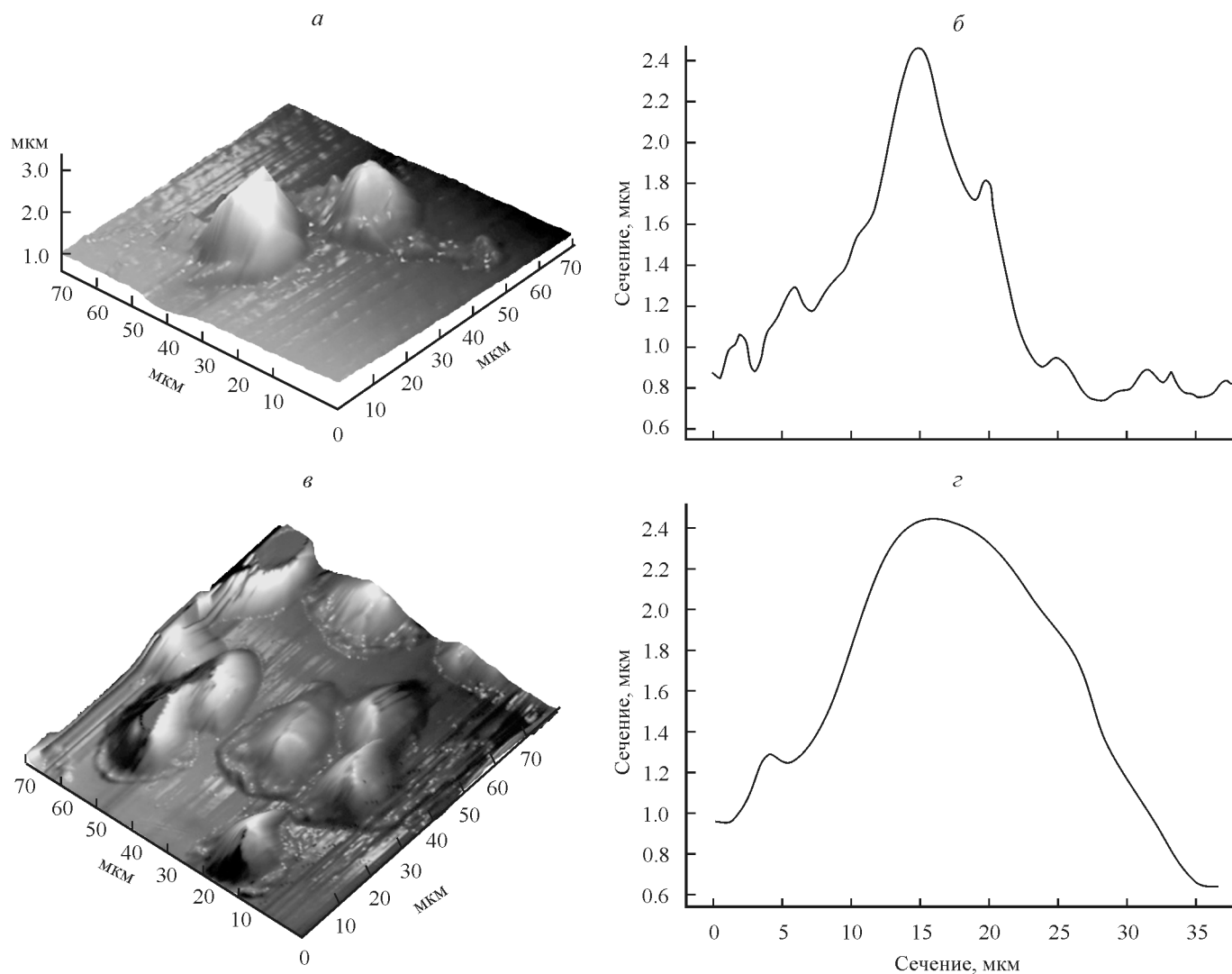
± 4.43) против 32.46 — 127.41 (81.32 ± 17.31) пг/мл в контроле). При этом в нейтрофилах при РТМ в отличие от контроля (0) регистрируется выработка фактора G-CSF (22.6 — 63.743) (5.62 ± 7.19) пг/мл. G-CSF относят к цитокинам, стимулирующим гемопоэз. Его используют для экспансии и дифференцировки нейтрофилов из гемопоэтических клеток-предшественников *in vitro* (Berliner et al., 1995). В целом существующие данные не обеспечивают четкой связи между повышенным уровнем G-CSF и экспансией нейтрофилов у больных раком (Brandau et al., 2013). Количество IFN- γ и IL-1Ra нейтрофилов больных РТМ не отличалось от соответствующих показателей здоровых доноров.

Механическая целостность клеток регулируется динамической сетью структурных и сигнальных молекул (Fletcher, Mullins, 2010). Показано, что аномалии упругости клеток связаны с патогенезом и прогрессированием заболевания (Cross et al., 2007). Используемый с конца 1990-х годов метод сканирующей зондовой микроскопии предоставил возможность изучать цитоархитектонику клетки без длительной и сложной фиксации, минимально искажая получаемую информацию. Исследование механических свойств мембраны нейтрофилов крайне важно, поскольку процессы диапедеза и миграции в тканях и процессы фагоцитоза сопровождаются изменением упруго механических свойств. Существуют данные об изменении механических свойств мембраны нейтрофилов при их активации (Подосинников и др., 1981) при выраженной гипоксии (Navajas, 2010) и при воздействии лазерного излучения (Генинг и др., 2011). С точки зрения поведения нейтрофилов в микроциркуляторном русле оценка их механических свойств позволит понять их способность к деформации и восстановлению. Увеличение деформации клеток и площади контакта нейтрофилов с эндотелием сосуда ведет к его повреждению (Roca-Cusachs et al., 2006).

Нами установлено снижение модуля Юнга нативных нейтрофилов больных РТМ по сравнению с нейтрофилами доноров (33.00 ± 2.63 против 47.49 ± 2.55 в контроле, $p = 0.0502$). Это свидетельствует о повышении эластичности и вязкости клеточной мембраны и снижении жесткости мембраны нейтрофилов больных РТМ на стадии Ia.

Результаты сканирования нейтрофилов в жидкой среде с использованием атомно-силового микроскопа представлены на рисунке. Нейтрофилы доноров распластаны по поверхности подложки, имеют округлую форму и достаточно равномерно распределенные цитоплазматические гранулы. Четко видны границы клетки, полиморфное сегментированное ядро и гранулы цитоплазмы, которые выявляются по боковому сечению (см. рисунок, а, б). Нейтрофилы больных РТМ характеризуются утратой овальной формы, появлением выростов, набуханием без внесения в среду стимулирующих агентов, свидетельствующим об активации калиевых каналов (Плескова, 2006) (см. рисунок, в), отсутствием четкого изображения ядра и невозможностью дифференцировать гранулы цитоплазмы (см. рисунок, г). Таким образом, результаты сканирования свидетельствуют об атипичной морфологии нейтрофилов периферической крови больных РТМ уже на стадии Ia заболевания.

ММП, входящие в семейство Zn-зависимых эндопептидаз, играют важную роль в разрушении экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ). В ряде исследований показана связь между ММП, деградацией ЭЦМ и опухолевой ин-



Изображение нейтрофилов доноров (а, б) и больных РТМ на стадии Ia (в, г) в жидкой среде, полученное в контактном режиме методом атомно-силовой микроскопии.

а, в — трехмерное изображение; б, г — поперечное сечение.

вазией (Egeblad, Werb, 2002; Fingleton, 2006). В то же время, по мнению ряда авторов, прямая связь между возрастанием экспрессии ММП, прогрессированием опухолевого процесса и метастазированием не может считаться установленной для всех типов опухолей (Ганусевич, 2010). К настоящему времени описано более 20 предста-

вителей семейства ММП, которые на основании клеточной локализации, первичной структуры и субстратной специфичности делятся на 5 подсемейств. ММП-1 и ММП-13 относят к подсемейству коллагеназ. При этом лучше изучена ММП-13. Установлено, что ее продуцируют многие типы опухолей. Основными продуцентами ее считают клетки стромы, а в ряде случаев — эпителиальные клетки (Ala-aho, Kahari, 2005) и нейтрофилы (Masson et al., 2005). Показано, что ММП-13 активно преобразует межклеточный матрикс, облегчая распространение опухолевых клеток (Nazawa et al., 2006). ММП-9 из подсемейства желатиназ дополняют коллагеназы в процессах деградации фибриллярных коллагенов, расщепляя коллагены IV и V типов, эластин и ряд белков соединительнотканного матрикса.

Наши исследования не показали значимых изменений активности ММП-13 и ММП-9 в нейтрофилах периферической крови больных РТМ (см. таблицу). Коллагеназа ММП-1 осуществляет первичную дегрануляцию молекул коллагена, после чего происходит их дальнейший распад под действием остальных ММП (Johansson et al., 2000). Активность ММП определяется уровнем

Активность ММП в нейтрофилах периферической крови у больных РТМ на стадии Ia

ММП	Здоровые (контроль)	Больные
ММП-1	0.508 ± 0.079 (0.389—0.743)	0.774 ± 0.103 ^a (0.713—1.063)
ММП-9	29.92 ± 0.81 (26.660—30.742)	30.63 ± 0.09 (29.61—30.742)
ММП-13	11.80 ± 3.58 (0—22)	13.00 ± 3.48 ^a (0—21)

Примечание. В скобках указан разброс данных. ^aПоказатели, значительно отличающиеся от контрольных при $p \leq 0.05$.

синтеза, активации и ингибирования (Davidson et al., 2002). Механизмы этой регуляции нам пока не ясны. Известны некоторые цитокины, гормоны, ферменты, влияющие на синтез и активацию ММП. Представляет интерес регуляция активности ММП, в частности ММП-1, как на уровне транскрипции, так и на уровне активации активными формами кислорода (АФК) (Lee et al., 2008; Shin et al., 2008). Ганусевич с коллегами (2010) показали наличие позитивной корреляции между уровнем АФК и активностью ММП в нейтрофилах крови (Burlaka et al., 2006). Нами установлено значимое возрастание ММП-1 в нейтрофилах периферической крови больных РТМ, коррелирующее с уровнем МПО ($r = 0.71$, $p = 0.04$).

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют предполагать влияние опухоли на нейтрофилы периферической крови. Многочисленные экспериментальные подтверждения имеет теория иммуноредактирования (Zitvogel et al., 2006; Swann, Smyth, 2007). Предполагается, что взаимодействие иммунной системы и злокачественной опухоли проходит в три стадии — элиминации, равновесия и избегания. На стадии элиминации цитокины и факторы роста, продуцируемые опухолью, изменяют морфофункциональное состояние нейтрофилов. В частности, повышенная секреторная активность, усиленная продукция АФК, усиленная экспрессия рецепторных белков могут быть результатом влияния неоплазмы на сигнальные пути нейтрофилов (Klink et al., 2008). Согласно схеме участия нейтрофилов во взаимоотношениях иммунной системы и растущей опухоли (Мальцева, Сафронова, 2009), стадия равновесия характеризуется изменением морфологии клетки при сохраняющейся гиперактивности. Не вызывает сомнения, что особенности каждой стадии, равно как и ее начало и окончание, будут определяться биологическим портретом опухоли и не обязательно совпадать с соответствующей клинической стадией заболевания.

Таким образом, изучение морфофункционального состояния нейтрофилов периферической крови у больных РТМ позволило нам установить увеличение их относительного количества, изменение рецепторного аппарата, усиление аэробной и анаэробной цитотоксичности и способности к фагоцитозу при одновременном снижении активности NET. Изменение секреторной активности нейтрофилов характеризовалось повышением уровня ММП-1, что, возможно, инициируется усиленной продукцией АФК, снижением уровня индуктора цитотоксической активности IL-2 и резким возрастанием уровня фактора G-CSF, стимулирующего гемопоэз. Архитектоника нейтрофилов на этой стадии РТМ характеризуется изменением их формы и утратой зернистости. Жесткость клеточной мембраны снижается, что позволяет предполагать состояние равновесия между иммунной системой и опухолью уже на клинической стадии Ia РТМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства образования и науки РФ.

Список литературы

Антонеева И. И., Генинг Т. П. 2007. Нейтрофильные гранулоциты в динамике прогрессии рака яичников. Клиническая лаб. диагностика. 8 : 43—46. (Antoneeva I. I., Gening T. P. 2007. Neutrophil granulocytes in the dynamics of progression of ovarian cancer. Klinicheskaya Lab. Diagnostika. 8 : 43—46.)

Бахман Я. В. 2002. Руководство по онкогинекологии. СПб.: Фолиант. 542 с. (Bachman J. V. 2002. Manual of gynecologic oncology. SPb.: Folio. 542.)

Ганусевич И. И. 2010. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. I. Характеристика ММП, регуляция активности, прогностическое значение. Онкология. 12 (1) : 10—16. (Ganusevich I. I. 2010. The role of matrix metalloproteinases (MMP) in malignant tumors. I. Characterization of MMP, regulation of their activity, prognostic value. Oncologiya. 12 (1) : 10—16.)

Генинг Т. П., Абакумова Т. В., Арсланова Д. Р., Воронова О. С., Генинг С. О., Костишко Б. Б. 2011. Морфофункциональное состояние нейтрофилов человека при воздействии фемтосекундного лазерного излучения in vitro. Известия вузов. Поволжский регион. 3 : 3—16. (Gening T. P., Abakumova T. V., Arslanova D. R., Voronova O. S., Gening S. O., Kostishko B. B. 2011. Morphofunctional state of human neutrophils at influence of femtosecond laser radiation in vitro. Izvestiya vuzov. Volga region. 3 : 3—16.)

Давыдов М. И., Аксель Е. М. 2014. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. М.: Изд. группа РОНЦ. 226 с. (Davydov M. I., Aksel E. M. 2014. Cancer statistics in Russia and the CIS in 2012. M.: Publ. Group of the Russian Cancer Research Center. 226 p.)

Долгушин И. И., Шишкова Ю. С., Семенова А. Б., Казачков Е. Л., Важенин А. В., Шаманова А. Ю., Димов Г. П. 2014. Взгляд на роль нейтрофильной внеклеточной ДНК, как компонента микроокружения опухоли, в процессах канцерогенеза. Уральский мед. журн. 2 (116) : 19—22. (Dolgushin I. I., Shishkova Y. S., Semenova A. B., Kazatchkov E. L., Vazhenin A. V., Shamanova A. Y., Dimov G. P. 2014. A look at the role of neutrophil extracellular DNA, as a component of the tumor microenvironment, in the process of carcinogenesis. Ural Med. J. 2 (116) : 19—22.)

Мальцева В. Н., Сафронова В. Г. 2009. Неоднозначность роли нейтрофилов в генезе опухоли. Цитология. 51 (6) : 467—474. (Maltseva V. N., Safronova V. G. 2009. The ambiguity of the role of neutrophils in the genesis of tumors. Tsitologiya. 51 (6) : 467—474.)

Нестерова И. В., Ковалева С. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Коков Е. А., Сторожук С. В. 2011. Особенности трансформации фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64(–) CD32(+) CD16(+) CD11b(+) и CD64(+) CD32(+) CD16(+) CD11b(+) пациентов с колоректальным раком под влиянием Г-КСФ, ИФН (альфа) и ИФН (гамма) in vitro. Аллергология и иммунология. 12 (3) : 256—268. (Nesterova I. V., Kovaleva S. V., Chudilova G. A., Lomtadidze L. V., Kokov E. A., Storozhuk S. V. 2011. Features of the phenotype transformation of neutrophil granulocyte subpopulations CD64(–) CD32(+) CD16(+) CD11b(+) and CD64(+) CD32(+) CD16(+) CD11b(+) of patients with colorectal cancer under the influence of G-CSF, IFN-alpha and IFN-gamma in vitro. Allergology and Immunology. 12 (3) : 256—268.)

Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Клещенко Е. И., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Смерчинская Т. В., Сапун О. И., Сторожук С. В. 2011. Варианты трансформации фенотипа нейтрофильных гранулоцитов CD64+CD32+CD11b+ у новорожденных с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями. Цитокины и воспаление. 10 (4) : 61—65. (Nesterova I. V., Kolesnikova N. V., Kleschenko E. I., Chudilova G. A., Lomtadidze L. V., Smartinska T. V., Breather O. I., Storozhuk S. V. 2011. Variants of transformation of the phenotype of neutrophil granulocytes CD64+CD32+CD11b+ in newborns with various infectious and inflammatory diseases. Cytokines and Inflammation. 10 (4) : 61—65.)

Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Ковалева С. В. 2012. Ремоделирование фенотипа нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком под влиянием рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF). Цитокины и воспаление. 11 (3) : 21—26. (Nesterova I. V., Kolesnikova N. V., Kovalev S. V. 2012. Remodeling phenotype of neutrophil granulocytes of patients with colorectal cancer under the influence of recombinant human granulocyte colony sti-

mulating factor (G-CSF). Cytokines and Inflammation. 11 (3) : 21—26.)

Писарева Л. Ф., Бояркина А. П., Одицова И. Н., Канторова А. А. 2007. Эпидемиологическая ситуация рака тела матки в регионе Сибири и Дальнего Востока. Состояние онкологической службы. Пути профилактики. Сиб. онкол. журн. Приложение: 77—80. (*Pisareva L. F., Boyarkina A. P., Odintsova I. N., Kantorova A. A. 2007.* Epidemiological situation of uterine body cancer in the region of Siberia and the Far East. The state of cancer services. Ways of prevention. Siberian J. Oncol. Application: 77—80.)

Плескова С. Н., Гущина Ю. Ю., Звонкова М. Б., Хомутов А. Е. 2006. Исследование морфологии и ригидности мембран нейтрофильных гранулоцитов в режиме реального времени методом сканирующей зондовой микроскопии. Бюл. эксперим. биол. мед. 41 (6) : 712—714. (*Pleskova S. N., Gushchina Y. Y., Zvonkova M. B., Khomutov A. E. 2006.* Study of morphology and rigidity of neutrophilic granulocyte membrane in the real time mode by scanning probe microscopy. Bull. Exp. Biol. Med. 141 (6) : 712—714.)

Подосинников И. В., Нилова Л. Г., Бабичев И. В. 1981. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов. Лаб. дело. 8 : 68—70. (*Podosinnikov I. V., Nilova L. G. Babichev I. V. 1981.* Method of determining the chemotactic activity of leukocytes. Lab. delo. 8 : 68—70.)

Рудик Д. В., Тихомирова Е. И. 2006. Методы изучения процесса фагоцитоза и функционально-метаболического состояния фагоцитирующих клеток. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. 112 с. (*Rudic D. V., Tikhomirova E. I. 2006.* Methods for studying the process of phagocytosis and functional and metabolic state of phagocytic cells. Saratov: Publ. Sarat. Univ. 112 p.)

Ala-aho R., Kahari V.-M. 2005. Collagenases in cancer. Biochimie. 87 : 273—286.

Berliner N., Hsing A., Graubert T., Sigurdsson F., Zain M., Bruno E., Hoffman R. 1995. Granulocyte colony-stimulating factor induction of normal human bone marrow progenitors results in neutrophil-specific gene expression. Blood. 85 : 799—803.

Borregaard N., Sorensen O. E., Theilgaard-Monch K. 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. Trends Immunol. 28 : 340—345.

Brandau S., Dumitru C. A., Lang S. 2013. Protumor and anti-tumor functions of neutrophil granulocytes. Semin. Immunopathol. Germany. 35 : 163—176.

Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 303 : 1532—1535.

Burlaka A. P., Sidorik E. P., Ganusevich I. I., Lestchenko Y. M., Burlaka A. A., Osinsky S. P. 2006. High formation of superoxide anion and nitric oxide, and matrix metalloproteinases activity in vascular wall of rectal carcinoma vessels. Exp. Oncol. 28 : 323—325.

Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., Gowing S., Chow S., Giannias B., Bourdeau F., Kubes P., Ferri L. 2013. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. J. Clin. Invest. pii: 67484.

Cross S. E., Jin Y. S., Rao J., Gimzewski J. K. 2007. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. Nat. Nanotechnol. 2 : 780—783.

Dallegri F., Ottonello L., Ballestrero A., Dapino P., Ferrando F., Patrone F., Sacchetti C. 1991. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. Inflammation. 15 : 15—30.

Davidson B., Reich R., Risberg B., Nesland J. M. 2002. The biological role and regulation of matrix metalloproteinases (MMP) in cancer. Arkh. Patol. 64 : 47—53.

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 : 420—442.

Dumitru C. A., Gholaman H., Trellakis S., Bruderek K., Dominas N., Gu X., Bankfalvi A., Whiteside T. L., Lang S., Brandau S.

2011. Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor modulates the biology of head and neck cancer cells via neutrophil activation. Int. J. Cancer. 129 : 859—869.

Egeblad M., Werb Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer. 2 : 161—174.

Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J. W., Comber H., Forman D., Bray F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. Eur. J. Cancer. 49 : 1374—1403.

Fingleton B. 2006. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. Front Biosci. 11 : 479—491.

Fletcher D. A., Mullins R. D. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. Nature. 463 : 485—492.

Fridlender Z. G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G. S., Albelda S. M. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: «N1» versus «N2» TAN. Cancer Cell. 16 : 183—194.

Halazun K. J., Hardy M. A., Rana A. A., Woodland D. C., Luyten E. J., Mahadev S., Witkowski P., Siegel A. B., Brown R. S., jr., Emond J. C. 2009. Negative impact of neutrophil-lymphocyte ratio on outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. Ann. Surg. 250 : 141—151.

He J. R., Shen G. P., Ren Z. F., Qin H., Cui C., Zhang Y., Zeng Y. X., Jia W. H. 2012. Pretreatment levels of peripheral neutrophils and lymphocytes as independent prognostic factors in patients with nasopharyngeal carcinoma. Head Neck. 34 : 1769—1776.

Johansson N., Ahonen M., Kähäri V. M. 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. Cell Mol. Life Sci. 57 : 5—15.

Klink M., Jastrzebska K., Nowak M., Bednarska K., Szpakowski M., Szylo K., Sulowska Z. 2008. Ovarian cancer cells modulate human blood neutrophils response to activation *in vitro*. Scand. J. Immunol. 68 : 328—336.

Kuang D. M., Zhao Q., Wu Y., Peng C., Wang J., Xu Z., Yin X. Y., Zheng L. 2011. Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. 54 : 948—955.

Lee K. J., Hwang S. J., Choi J. H., Jeong H. G. 2008. Saponins derived from the roots of *Platycodon grandiflorum* inhibit HT-1080 cell invasion and MMPs activities: regulation of NF-kappaB activation via ROS signal pathway. Cancer Lett. 268 : 233—243.

Masson V., de la Ballina L. R., Munaut C., Wielockx B., Jost M., Maillard C., Blacher S., Bajou K., Itoh T., Itohara S., Werb Z., Libert C., Foidart J. M., Noel A. 2005. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. FASEB J. 19 : 234—236.

Navajas D. 2010. Nanomechanics of living cells. Book of Abstracts IV Spanish Portuguese Biophysical Congress. Spain. 33.

Nozawa H., Chiu C., Hanahan D. 2006. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103 : 12 493—12 498.

Pickaver A. H., Ratcliffe N. A., Williams A. E., Smith H. 1972. Cytotoxic effects of peritoneal neutrophils on a syngeneic rat tumor. Nat. New Biol. 235 : 186—187.

Roca-Cusachs P., Almendros I., Sunyer R., Gavara N., Farre R., Navajas D. 2006. Rheology of passive and adhesion-activated neutrophils probed by atomic force microscopy. Biophys. J. 91 : 3508—3518.

Rotondo R., Barisione G., Mastracci L., Grossi F., Orenzo A. M., Costa R., Truini M., Fabbi M., Ferrini S., Barbieri O. 2009. IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. Int. J. Cancer. 125 : 887—893.

Sangaletti S., Tripodo C., Vitali C., Portararo P., Guarnotta C., Casalini P., Cappetti B., Miotti S., Pinciroli P., Fuligni F., Fais F., Piccaluga P. P., Colombo M. P. 2014. Defective stromal remodeling and neutrophil extracellular traps in lymphoid tissues favor the transition from autoimmunity to lymphoma. Cancer Discov. US. 4 : 110—129.

Schmidt H., Bastholt L., Geertsen P., Christensen I. J., Larsen S., Gehl J., von der Maase H. 2005. Elevated neutrophil and

monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *Br. J. Cancer.* 93 : 273—278.

Shin M. H., Moon Y. J., Seo J. E., Lee Y., Kim K. H., Chung J. H. 2008. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. *Free Rad. Biol. Med.* 44 : 635—645.

Swann J. B., Smyth M. J. 2007. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* 117 : 1137—1146.

Wartha F., Henriques-Normark B. E. 2008. Tosis: a novel cell death pathway. *Sci. Signal.* US. 1 : 25.

Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* 6 : 715—727.

Поступила 21 IX 2015

PHENOTYPE OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN THE INITIAL STAGE OF ENDOMETRIAL CANCER

T. V. Abakumova,¹ I. I. Antoneeva, T. P. Gening, D. R. Dolgova, S. O. Gening

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, 432017;

¹ e-mail: taty-abakumova@yandex.ru

We have examined peripheral blood neutrophils from 123 patients with primary endometrial cancer at stage Ia. Receptor system and the ability of neutrophils to form extracellular traps were assessed by fluorescence microscopy, the spontaneous production of cytokines IL-2, IFN- γ , G-CSF, matrix metalloproteinases-1,9,13 by the method of enzyme-linked immunosorbent assay, phagocytic activity, myeloperoxidase activity, the level of cationic proteins activity in NBT-test were evaluated by cytochemical methods, activity of neutrophils in the spontaneous NBT-test was used to evaluate the oxygen-dependent bactericidal action of neutrophils. The topology and the rigidity of the membrane of neutrophils were assessed by scanning probe microscopy. We have shown that the increase in the relative number of neutrophils lead to a change in their receptor system, aerobic and anaerobic cytotoxicity and ability to phagocytosis are enhanced while reducing NET-activity. We have observed a change in the secretory activity of neutrophils, which is characterized by increased level of MMP-1, possibly initiated by enhanced production of reactive oxygen species, by a reduction in the IL-2 level (inductor of cytotoxic activity) and a sharp increase in the level of the G-CSF. Architectonics of neutrophils in the case of endometrial cancer at stage Ia is characterized by changing the shape and loss of grit. The rigidity of the cell membrane decreased. Changes in the morphology of neutrophils on the background of the continuing hyperactivity suggests that a state of balance between the immune system and the tumor is already in stage Ia endometrial cancer.

Key words: peripheral blood neutrophils, endometrial cancer.