

На правах рукописи

**Семенова  
Анна Борисовна**

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО  
КОМПОНЕНТА МИКРООКРУЖЕНИЯ КАРЦИНОМ МОЛОЧНОЙ  
ЖЕЛЕЗЫ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ И  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОДТИПОВ**

14.03.02 – патологическая анатомия

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Курган – 2018

Работа выполнена на кафедрах патологической анатомии и судебной медицины, микробиологии, вирусологии, иммунологии, аллергологии и клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

Доктор медицинских наук, профессор

Казачков Евгений Леонидович

Академик РАН, доктор медицинских наук,  
профессор, заслуженный деятель науки РФ

Долгушин Илья Ильич

Официальные оппоненты:

Андреева Юлия Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии, профессор;

Петров Семен Венедиктович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра общей патологии, профессор;

Нестерова Ирина Вадимовна, доктор медицинских наук, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», кафедра аллергологии и иммунологии, профессор

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 999.063.03 при ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (6, ул. М. Ульяновой, г. Курган, 640014).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России и на сайте [ilizarov.ru](http://ilizarov.ru).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, доктор медицинских наук, профессор

Дьячков Александр Николаевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

Современный этап развития онкологии характеризуется высоким уровнем внедрения прогрессивных технологий, совершенствованием методов диагностики и лечения злокачественных опухолей различных локализаций, проведением целенаправленных биомедицинских исследований [Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению в 2016 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2017. – 236 с; Жукова, Л.Г. Достижения в лечении рака молочной железы за 2014 год / Л.Г. Жукова // Практическая онкология. – 2015. – Т. 16, №1(61). – С. 32-37]. Для эффективного лечения злокачественного новообразования необходимо своевременное выявление и получение полной информации о локализации и размерах, источниках его кровоснабжения, о гистоструктуре и взаимоотношениях с окружающими тканями [Безнос, О.А. Взаимосвязь субпопуляций интратуморальных лимфоцитов с клиническими и патоморфологическими особенностями рака молочной железы / О.А. Безнос, Д.А. Буров, В.Ю. Сельчук [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2016. – Т. 12, №2. – С. 13-17].

Одной из важных особенностей злокачественных новообразований является их относительно автономный рост, регулируемый локально продуцируемыми факторами, к которым относят «факторы микроокружения» опухолей [Стахеева, М.Н. Комплекс информативных иммунологических показателей для прогноза прогрессирования рака молочной железы / М.Н. Стахеева, А.П. Серых, С.И. Карась [и др.] // Бюл. сибирской медицины. – 2015. – Т. 14, №3. – С. 30-34], продуцируемые как самими опухолевыми клетками, так и клетками окружающей их стромы. Принято считать [Jorch, S.K. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease / S.K. Jorch, P. Kubes // Nature Medicine. – 2017. – Vol. 23. – P. 279-287], что продуцируемые эндотелиальными клетками, моноцитами, макрофагами, лимфоцитами и тучными клетками интерлейкины, простагландины, регуляторные пептиды прямо или косвенно влияют на пролиферацию и индуцированную гибель опухолевых клеток.

В последние годы появились исследования [Божок, А.А. Прогностические и предсказательные факторы при раке молочной железы / А.А. Божок, В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов [и др.] // Вопр. онкологии. – 2005. – Т. 51, №4. – С. 434-443], в которых лимфоциты, инфильтрирующие новообразование, рассматриваются как фактор прогноза течения опухолевого процесса. В этих

работах речь идет о так называемом TIL-факторе (tumor infiltrating lymphocytes), его составе, представительстве и многокомпонентности.

Действительно, сегодня установлено [Douglass, S. The role of FOXP3 in the development and metastatic spread of breast cancer / S. Douglass, S. Ali, A.P. Meeson [et al.] // *Cancer Metastasis Rev.* – 2012. – Vol. 31. – P. 843-854; Zhu, Y. CD8+/FOXP3+ ratio and PD-L1 expression associated with survival in pT3N0M0 stage esophageal squamous cell cancer / Y. Zhu, M. Li, D. Mu [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, №44. – P. 71455-71465], что чем выраженнее явление «уклонения опухолевых клеток от воздействия иммунной системы», тем хуже прогноз течения болезни.

Сведения о нейтрофильных гранулоцитах, являющихся постоянным компонентом в структуре микроокружения опухолей и играющих неоднозначную роль в онкогенезе, противоречивы. Нейтрофильные гранулоциты на тканевом уровне являются неперенным компонентом антимикробных и воспалительных реакций [Dwivedi, N. Deimination of linker histones links neutrophil extracellular trap release with autoantibodies in systemic autoimmunity / N. Dwivedi, I. Neeli, N. Schall [et al.] // *FASEB J.* – 2014. – Vol. 28, №7. – P. 2840-2851], а кроме того могут являться участниками процесса формирования и развития опухоли. Кроме того, установлено [Савочкина, А.Ю. Показатели местной иммунореактивности у женщин с воспалительными заболеваниями нижнего отдела урогенитального тракта / А.Ю. Савочкина, М.А. Зотова, К.В. Никушкина [и др.] // *Здоровье и образование в XXI веке.* – 2017. – №5. – С. 113-115], что нейтрофилы – это секреторные клетки, способные выделять биологически активные продукты, с помощью которых способны осуществлять внеклеточный киллинг и медиаторные контакты с гуморальными системами и клетками крови. В других исследованиях [Dedeurwaerder, S. DNA methylation profiling reveals a predominant immune component in breast cancers / S. Dedeurwaerder, C. Desmedt, E. Calonne [et al.] // *EMBO Mol Med.* – 2011. – Vol. 3. – P. 726-741] в регрессии опухолевого процесса с участием нейтрофилов ключевую роль отводят активным формам кислорода, азота и некоторым цитокинам, продуцируемым этими клетками.

Установлено [Xu, J. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis / J. Xu, X. Zhang, R. Pelayo [et al.] // *Nature medicine.* – 2009. – Vol. 15, №11. – P. 1318-1321], 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, НВЛ), способные задерживать и убивать микроорганизмы.

Фундаментальные исследования, посвященные проблеме взаимоотношений между нейтрофилами микроокружения опухоли и опухолевыми клетками в доступной нам литературе не обнаружено, а данные научных публикаций по этой проблеме малочисленны и противоречивы. Появление новых литературных данных и трактовок и неоднозначность суждений о роли различных клеточных компонентов микроокружения в канцерогенезе, окружающих опухолевые клетки и активно взаимодействующих с ними, способных при этом оказывать как противо-, так и проопухолевое воздействие, позволяет считать обозначенную проблему актуальной.

**Цель исследования:** Дать морфофункциональную характеристику клеточных компонентов микроокружения инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа в зависимости от степени злокачественности и молекулярно-генетических подтипов с целью улучшить прижизненную морфологическую диагностику данных новообразований.

**Задачи исследования:**

1. Оценить медико-социальный портрет пациенток с инвазивными карциномами молочной железы неспецифического типа различной степени злокачественности и молекулярно-генетического подтипа.
2. Дать морфологическую характеристику интра-туморальной, перитуморальной и дистантной зон в инвазивных карциномах молочной железы неспецифического типа различной степени злокачественности и молекулярно-генетических подтипов путем детализации клеточного состава микроокружения в них.
3. Изучить *in vitro* характер функционального ответа нейтрофильных гранулоцитов периферической крови доноров при инкубации со взвесью перевиваемых клеточных линий опухолевых клеток эпидермоидной карциномы гортани (клон HEp-2 человек), рабдомиосаркомы (клон RD человек).
4. Исследовать *in vitro* функциональную активность аутологичных и гетерологичных донорских нейтрофильных гранулоцитов и процессов формирования ими сетей внеклеточной дезоксирибонуклеиновой кислоты при инкубации с опухолевыми клетками инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа в зависимости от степени злокачественности и молекулярно-генетического подтипа.
5. Оценить особенности межклеточных взаимодействий между перевиваемыми клеточными линиями эпидермоидной карциномы гортани (клон HEp-2 человек), рабдомиосаркомы (клон RD человек) и нейтрофильными гранулоцитами под влиянием моделированного низкоинтенсивного

микроволнового излучения Солнца в диапазоне частот (4,0-4,3) ГГц электромагнитного излучения и моделированного техногенного излучения на частоте 4,1 ГГц.

6. Разработать дополнительный критерий определения степени злокачественности инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа путем обнаружения внеклеточных сетей дезоксирибонуклеиновой кислоты в мазках-отпечатках с целью оптимизации схемы морфологической диагностики карцином молочной железы.

### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационной работы была спланирована в соответствии с целью и задачами исследования. В клиническом разделе работы объектами исследования явились 555 женщин в возрасте от 29 до 78 лет с диагнозом рак молочной железы I, IIa, IIb, IIIa стадий. Из них 307 пациенток были направлены на оперативное лечение в ГБУЗ «Челябинский областной клинический онкологический диспансер» (ГБУЗ «ЧОКОД»), как первый этап комбинированного лечения, а операционный материал от 248 пациенток поступил на иммуногистохимическое исследование. Морфологический раздел работы выполнен в патологоанатомическом отделении лабораторно-диагностической службы ГБУЗ «ЧОКОД», являющимся клинической базой кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. Критерий включения: гистологический диагноз инвазивная карцинома неспецифического типа молочной железы, установленный при анализе трепан - биопсии на амбулаторном этапе. Критерий исключения – клиничко-морфологические признаки острого мастита. У всех пациенток изучали направления на гистологическое, иммуногистохимическое исследование. У 307 пациенток изучали выписные эпикризы.

В экспериментальном разделе работы объектами исследования были нейтрофильные гранулоциты, выделенные из периферической крови здоровых доноров, нейтрофильные гранулоциты, выделенные из периферической крови женщин с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы, перевиваемые клеточные линии опухолевых клеток HEp-2 и RD, выделенные опухолевые клетки из карциномы молочной железы. В эксперименте участвовали 20 здоровых доноров (женщины в возрасте от 20 до 30 лет в первой фазе менструального цикла) и женщины с карциномами молочной железы (24 пациентки с карциномой молочной железы низкой степени злокачественности, 26 пациенток с карциномой молочной железы умеренной степени злокачественности и 20 пациенток с карциномой молочной железы высокой степени злокачественности). Все обследуемые пациентки давали

информированное добровольное согласие на забор материала: периферической крови, фрагмента опухоли из операционного материала.

Для исследования полиморфно-клеточного инфильтрата производилась оценка фрагмента опухоли из центра, называемая ниже интратуморальная зона (размером 1,0\*0,5\*0,3 см). Следующий фрагмент, называемый ниже перитуморальной зоной (параканкрозной зоной), брался с края новообразования с предполагаемой зоны активного опухолевого роста и ткани молочной железы на границе с опухолью. Общая длина данного фрагмента составляла 2,0 см, толщина 0,3 см. Исследованию подвергался третий фрагмент из ткани молочной железы на расстоянии от опухолевого узла более 3,0 см размером 1,0\*0,5\*0,3 см, обозначаемый далее как дистантная зона.

Для изучения функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов изучали интактные и активированные нейтрофилы. Индуктором служили опухолевые клетки (эпидермоидной карциномы гортани (клон НEr-2 человек), рабдомиосаркомы (клон RD человек)) и клетки, выделенные из инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа, различной степени злокачественности и молекулярно-генетических подтипов).

#### **Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора**

Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе наблюдений экспериментального фрагмента работы, полноте и широте литературно-биографической справки, использовании современных методов статистической обработки материалов с применением программы IBM SPSS Statistics 21.

Основные положения работы обсуждены на XIII Международном медицинском конгрессе EUROMEDICA 2014 (Ганновер, Германия, 2014 г.), на I Всероссийской научно-практической конференции «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека» (Челябинск 2015 г.), на II Всероссийской научно-практической конференции «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека» (Челябинск 2016 г.), на XXXI Международном Конгрессе IAP (международная академия патологии) и 28-м Конгрессе ESP (европейского общества патологии) (Кельн, Германия, 2016).

**Личный вклад** соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Планирование научной работы, постановка цели и задач проводилась совместно с научными консультантами. Выбор методов и моделей, набор материала, научно-информационный поиск, анализ и обобщение данных научной литературы, анализ и интерпретация

полученных данных, статистическая обработка, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях, написание и оформление рукописи выполнены автором лично и при участии сотрудников научно-исследовательского института иммунологии Южно-Уральского государственного медицинского университета (НИИ иммунологии ЮУГМУ).

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Наиболее выраженная Т- и В-лимфоцитарная инфильтрация перитуморальной, интратуморальной и дистантной зон регистрируется в карциномах высокой степени злокачественности (G3) с формированием в зоне активного опухолевого роста лимфоцитарных скоплений, плотность которых прямо пропорционально зависит от степени злокачественности опухоли.
2. Нейтрофильные гранулоциты периферической крови при инкубации с опухолевыми клетками активируются и реализует неспецифический характер реагирования – нетоз. На этапе первичного контакта опухолевых клеток и нейтрофилов биологический смысл формирования внеклеточных сетей ДНК заключается в попытке реализации неспецифического эффекта уничтожения опухоли.
3. Механизм образования нейтрофильных внеклеточных ловушек обладает определенной специфичностью. В случае взаимодействия аутологичных нейтрофилов с опухолевыми клетками, они активируются и, быстрее формирует внеклеточные сети ДНК, что возможно связано с эффектом преактивации «премирования» нейтрофилов собственными опухолевыми клетками.
4. Нейтрофилы наиболее интенсивно и быстро формируют внеклеточные сети ДНК в опухолях G3, по сравнению с G1, в большей своей части располагаясь непосредственно вблизи опухолевых клеток, оплетая их, отграничивая друг от друга, или наоборот, сближая опухолевые клетки между собой. Уменьшение экспрессии на опухолевых клетках рецепторов к прогестерону (люминальный тип В, HER2 позитивный), наличие гиперэкспрессии HER2 (тройной негативный тип, нелюминальный), а также приближение к базальноклеточной дифференцировке тройного негативного типа демонстрируют более выраженную способность к активации нейтрофилов с формированием внеклеточных ловушек.
5. Формирование внеклеточных сетей ДНК нейтрофилами при инкубации с опухолевыми клетками и как результат ассоциативный комплекс – опухолевая клетка или группа их, окруженная внеклеточными сетями ДНК -



является одним из механизмов «уклонения» или экранирования опухолевой клетки от эффекторных противоопухолевых механизмов иммунной системы.

### **Научная новизна исследования**

В работе впервые показано образование внеклеточных ловушек нейтрофилами периферической крови после взаимодействия с перевиваемыми клеточными линиями опухолевых клеток HEr-2 (человек, эпидермоидная карцинома гортани), RD (человек, рабдомиосаркома)) и оценена их противоопухолевая эффективность.

Впервые исследован клеточный состав микроокружения в интратуморальной, перитуморальной и дистантной зонах инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа в зависимости от степеней злокачественности и молекулярно-генетических подтипов.

Впервые произведено сравнительное изучение формирования сетей внеклеточной ДНК нейтрофилами микроокружения в интратуморальной, перитуморальной и дистантной зонах в операционном материале исследуемых инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа различных степеней злокачественности и молекулярно-генетических типов.

Разработан способ обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек в перитуморальной зоне карциномы молочной железы как дополнительного критерия степени злокачественности опухоли, который применен при интраоперационной морфологической диагностике с целью раннего определения прогноза течения заболевания.

Оптимизирована схема морфологической диагностики эпителиальных карцином различных локализаций, биологических характеристик и степени злокачественности в зависимости от способности аутологичных нейтрофилов - значимых компонентов микроокружения опухолей, к формированию внеклеточных сетей ДНК.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Результаты исследования позволяют расширить представление о роли клеточного компонента микроокружения в прогнозе и течении инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа в зависимости от степени злокачественности и молекулярно-генетических подтипов.

Полученные данные о содержании нейтрофилов в интра- и перитуморальной зонах карцином молочной железы, а также продукция нейтрофильных внеклеточных сетей ДНК имеют существенное значение в понимании проблемы регулирующего влияния нейтрофильных гранулоцитов в процессах опухолевой прогрессии, а также позволяют расширить

представление о роли нейтрофилов, как компонента микроокружения опухолей, в процессах канцерогенеза.

Разработка экспресс-метода оценки степени злокачественности карциномы молочной железы с помощью определения нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей открывает возможность применить его для интраоперационной цитологической и гистологической диагностики с целью определения прогноза опухолевой прогрессии.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты исследований опубликованы в центральной печати, использованы в учебном процессе при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами 3-6 курсов, интернами и клиническими ординаторами на кафедрах онкологии, патологической анатомии, микробиологии, иммунологии, вирусологии и клинической лабораторной диагностике ФГБОУ ВО «Южно-уральского государственного медицинского университета», практической работе врачей-онкологов, патологоанатомов.

Изданы методические рекомендации для врачей-патологоанатомов и студентов, внедренные в деятельность врачей ГБУЗ «Челябинский областной клинический онкологический диспансер».

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 28 научных работ, в том числе 15 из перечня изданий, рекомендованных ВАК, 1 из списка Web of Science, Scopus, 1 учебно-методическое пособие.

### **Структура и объем диссертации**

Работа изложена на 230 страницах текста, иллюстрирована 33 таблицами, 60 рисунками, 1 схемой. Состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 496 источников, в том числе 188 отечественных и 308 зарубежных.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

В клиническом разделе работы объектами исследования явились 555 женщин в возрасте от 29 до 78 лет с диагнозом рак молочной железы I, IIa, IIb, IIIa стадий. Из них 307 пациенток были направлены на оперативное лечение в ГБУЗ «Челябинский областной клинический онкологический диспансер» (ГБУЗ «ЧОКОД») (главный врач – академик РАН, профессор, д.м.н. Важенин А.В.), как первый этап комбинированного лечения, а операционный материал от 248 пациенток поступил на иммуногистохимическое исследование.

Морфологический раздел работы выполнен в патологоанатомическом отделении лабораторно-диагностической службы ГБУЗ «ЧОКОД», являющимся клинической базой кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. Критерий включения: гистологический диагноз инвазивная карцинома неспецифического типа молочной железы, установленный при анализе трепан - биопсии на амбулаторном этапе. Критерий исключения – клинико-морфологические признаки острого мастита. У всех пациенток изучали направления на гистологическое, иммуногистохимическое исследование. У 307 пациенток изучали выписные эпикризы.

В экспериментальном разделе работы объектами исследования были нейтрофильные гранулоциты, выделенные из периферической крови здоровых доноров, нейтрофильные гранулоциты, выделенные из периферической крови женщин с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы, перевиваемые клеточные линии опухолевых клеток HEp-2 и RD, выделенные опухолевые клетки из карциномы молочной железы. В эксперименте участвовали 20 здоровых доноров (женщины в возрасте от 20 до 30 лет в первой фазе менструального цикла) и женщины с карциномами молочной железы (24 пациентки с карциномой молочной железы низкой степени злокачественности, 26 пациенток с карциномой молочной железы умеренной степени злокачественности и 20 пациенток с карциномой молочной железы высокой степени злокачественности). Все обследуемые пациентки давали информированное добровольное согласие на забор материала: периферической крови, фрагмента опухоли из операционного материала. Работа проводилась на базе Научно-исследовательского института иммунологии Южно-Уральского государственного медицинского университета (НИИ иммунологии ЮУГМУ, директор академик РАН профессор, д.м.н. Долгушин И.И.).

Линия №1. Происхождение: человек, эпидермоидная карцинома гортани, клон HEp-2. Получена в ЕНИИВИ Глинских Н.П. с соавт. а.с. N 1122693 от 27.09.83. Морфология: эпителиоподобная. Способ культивирования: монослойный. Условия культивирования: среда – ЕМЕМ/гидролизат альбумина (1:1) сыворотка - КРС 5%. Процедура пересева – снятие клеток, используя версен 0.02%, кратность посева 1:4-1:6, оптимальная плотность 0.7-1.2x10<sup>5</sup> клеток/мл. Жизнеспособность после криоконсервации: 90% (окраска трипановым синим на нулевом пассаже). Контроль контаминации: бактерии, грибы и микопlasма не обнаружены. Контроль видовой идентичности: кариологический и изоферментный (лактатдегидрогеназа, глюкоза 6 фосфатдегидрогеназа) анализ. Кариология: 2n = 46, пределы изменчивости по

числу хромосом 54-68, модальное число хромосом 56. Эффективность клонирования: 60%.

Линия №2. Линия клеток RD, рабдомиосаркома, человек. Получен в ЕНИИВИ в 1992 г. Морфология: фибробластоподобная. Способ культивирования: монослойный. Условия культивирования: среда - ЕМЕМ сыворотка- эмбриональная бычья 5%. Процедура посева - снятие клеток, используя версен 0.02%, кратность посева 1:4, оптимальная плотность  $1.2 \times 10^5$  клеток/мл. Жизнеспособность после криоконсервации: 75 % (окраска трипановым синим на нулевом пассаже). Контроль контаминации: бактерии, грибы и микопlasма не обнаружены. Контроль видовой идентичности: кариологический и изоферментный (лактатдегидрогеназа, глюкоза 6 фосфатдегидрогеназа) анализ. Кариология:  $2n=46$ , пределы изменчивости по числу хромосом 42-80, модальное число хромосом 48. Эффективность клонирования: 85 %.

Морфологические методы. Забор ткани опухоли молочных желез у пациенток осуществляли стерильным скальпелем в контейнер одноразового использования в течение 10 минут после радикальной мастэктомии по Маддену или Пейти. Диагноз верифицировали при срочном гистологическом исследовании или ранее при трепанобиопсии: инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа. Молочная железа рассекалась в проекции опухоли и забиралось два фрагмента с периферии узлового образования с окружающей тканью 0,5 см x 0,5 см x 0,2 см.

Один фрагмент забирался в пробирку и направлялся на подготовку к иммунологическому этапу исследования. Второй образец исследуемой ткани был размещен в специальную гистологическую кассету и соответствующим образом промаркирован. Далее материал был помещен в емкости с 10% раствором нейтрального забуференного формалина сразу после взятия. Флаконы с материалом содержались при температуре не менее +4 °С. Соотношение объема фиксирующего агента и тканевого образца было не менее 20:1. Фиксация проводилась в течение 12-24 часов, что является оптимальным временем для данной методики и позволяет избежать неспецифические реакции в дальнейшем исследовании. После фиксации материал помещался в гистопроцессор вакуумного типа «Sakura Tissue-Tek Xpress x50» для замещения фиксирующего агента парафином через серию растворов. Далее происходило изготовление парафиновых блоков путем заливки материала горячим парафином. Стоит отметить, что температура горячей части заливочного комплекса не превышала 60°C – это необходимая температура плавления парафина, которая позволяет предотвратить температурную деградацию

антигенов. В тех случаях, когда для исследования мы выбирали парафиновые блоки, один из блоков мы выбирали с границы с окружающими тканями из зоны предполагаемого активного опухолевого роста. Второй фрагмент ткани в парафиновом блоке, в том случае, если присутствовала сплошь опухоль, мы принимали как интратуморальную зону, а фрагмент из дистантной зоны выбирался из традиционно забранного фрагмента ткани молочной железы на удалении. Микротомия проводилась на ротационных микротоммах. Толщина срезов не превышала 5 мкм, таким образом, не происходило наложение слоев клеток друг на друга. После микротомии срезы помещались в емкость с теплой водой, где они расправлялись и далее перемещались на стекла с адгезивным покрытием. Далее стекла сушились в вертикальном положении, чтобы удалить излишки воды путем стекания. Часть срезов окрашивалась гематоксилином-эозином для рутинного исследования, часть – готовилась для иммуногистохимического исследования. Стекла со срезами помещались в нагретый до 60°C термостат на период от 30 мин до 1 часа. Затем микропрепараты переносились в емкости с ксилолом для полного удаления парафина, проводились по батарее спиртов с постепенным понижением концентрации спирта до полностью водного раствора. Влажные микропрепараты помещались в цитратный буфер для демаскировки антигена с рН 6,0. Процедура демаскировки производилась в аппарате «Dako PTLINK» с использованием автоматизированного и специализированного протокола, включающего в себя предварительный нагрев, восстановление антигена и дальнейшее охлаждение. Восстановление антигена длилось 20 минут при температуре 97°C. Далее микропрепараты помещались в автостейнер «Dako AutostainerLink48» для проведения иммуногистохимической реакции со стандартизированными протоколами с моноклональными и поликлональными антителами. После этого производилась дополнительная докраска гематоксилином и заключение срезов под пленку в мультистейнере «Sakura Tissue-Tek Prisma+Film». Затем микропрепараты помещались в сканирующее устройство «Leica APERIO CS2» (США) для получения цифровых изображений для дальнейшего исследования и анализа. При иммуногистохимических исследованиях подсчет абсолютного числа всех окрашенных клеток выполняли в 10 полях зрения при увеличении микроскопа x 400.

Для формирования групп исследования использовали способ определения степени злокачественности карцином молочной железы. Среди 555 обследованных женщин оказалось 100 пациенток с карциномами молочной железы низкой степени злокачественности G1, 227 пациенток с карциномами

умеренной степени злокачественности G2 и 228 пациенток с карциномами высокой степенью злокачественности G3.

Во всех исследуемых карциномах степень злокачественности определялась согласно критериям Ноттингемской классификации (система градирования Scarff-Bloom-Richardson в модификации E Iston-Ellis) [Франк, Г.А. Классификация опухолей молочной железы ВОЗ 2012 года / Г.А. Франк, Н.В. Данилова, Ю.Ю. Андреева [и др.] // Арх. патологии. – 2013. – №2. – С. 53-63]. Ноттингемская система определения степени злокачественности оценивает 3 критерия: формирование железистых структур, выраженность ядерного полиморфизма и число митозов. Каждый признак оценивается в баллах от 1 до 3. Определение степени злокачественности инвазивного рака молочной железы по Ноттингемской системе: 1) формирование железистых структур: более 75 % от площади опухоли – 1 балл; 10–75 % от площади опухоли – 2 балла; менее 10 % от площади опухоли – 3 балла; 2) ядерный полиморфизм: мелкие однотипные ядра – 1; умеренное увеличение размера – 2; выраженный полиморфизм – 3; 3) митотическая активность (диаметр поля зрения 0,50 мм)  $\leq 7$ ; 8-14;  $\geq 15$ . Сумма баллов определяла гистологическую степень злокачественности: G1 – сумма баллов 3–5; G2 – сумма баллов 6 - 7; G3 – сумма баллов 8 – 9.

Для дальнейшего формирования групп исследования молекулярно-генетический подтип опухолей определялся согласно критериям классификации A. Prat et al (2013) [Prat, A. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer / A. Prat, M.C. Cheang, M. Martin [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2013. – Vol. 31, №2. – P. 203-209]. Согласно данной классификации, выделяют следующие варианты рака молочной железы, различающиеся по прогнозу и чувствительности к различным видам лекарственной терапии: люминальный А – Er(+) и/или Pr(+), Ki67 (<20%), HER2/neu(–) (n=100); люминальный В негативный – Er(+) и/или Pr(+), Ki67 (>20%), HER2/neu(–) (n=108); люминальный В позитивный – Er(+) и/или Pr(+), Ki67 (>20%), HER2/neu(+) (n=120); HER2-позитивный – Er(–), Pr(–), Ki67 (>20%), HER2/neu(+) (n=106); тройной негативный тип с базальным фенотипом – Er(–), Pr(–), Ki67 (>20%), HER2/neu(–), СК 5/6 (+) (n=42); тройной негативный тип без базального фенотипа – Er(–), Pr(–), Ki67 (>20%), HER2/neu(–), СК 5/6 (+) (n=69).

Для исследования воспалительного инфильтрата, как одного из наиболее важных компонентов стромы в любых карциномах, в том числе и молочной железы, производилась оценка фрагмента опухоли из центра, называемая ниже интрауморальная зона (размером 1,0\*0,5\*0,3 см). Следующий фрагмент брался

с края новообразования с предполагаемой зоны активного опухолевого роста и ткани молочной железы на границе с опухолью. Общая длина данного фрагмента составляла 2,0 см, толщина 0,3 см - называемая ниже перитуморальная зона (параканкротная зона). Также брался фрагмент из ткани молочной железы на расстоянии от опухолевого узла более 3,0 см размером 1,0\*0,5\*0,3 см - называемый ниже - дистантная зона, вне проекции путей лимфооттока к регионарным лимфатическим узлам. Исследование клеточных элементов воспалительно-клеточного инфильтрата, располагающихся в выше обозначенных зонах, осуществлялось с помощью моноклональных антител (Dako, Дания) к CD4 (clone 4B12), CD8 (clone C8/144B), CD56 (clone 123C3), CD20 (clone L26) и CD 79.

Иммунологические методы. Для получения чистой фракции нейтрофилов кровь забирали из локтевой вены, добавляли гепарин из расчета 10 ЕД («Гедон-Рихтер», Hungery) на 10 мл крови. Затем 2 мл гепаринизированной крови смешивали с 3 мл стерильного физиологического раствора (0,9 % раствор NaCl), полученную смесь наслаивали на градиент плотности стерильных растворов фиколла-верографина (Pharmacia, Sweden; Spofa, CSSR). Плотность верхнего слоя градиента составляли 1,075-1,077, нижнего – 1,093-1,095. 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, после чего доводили до концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл и использовали для оценки функционального статуса нейтрофилов. Для получения фракции опухолевых клеток карцином молочной железы забирался фрагмент ткани опухоли, механически измельчался в гомогенизаторе 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. 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 клетках. Живыми прозрачными (трипанонегативные клетки) оставалось более 80% клеток, мертвыми – менее 20 % клеток, которые окрашивались в фиолетовый цвет (трипанопозитивные клетки).

Для изучения функциональной активности нейтрофилов изучали интактные и активированные нейтрофилы. Индуктором служили опухолевые клетки (клеточные линии опухолевых клеток HEp-2 (человек, эпидермоидная карцинома гортани), RD (человек, рабдомиосаркома) и клетки, выделенные из инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа, различной степени злокачественности и молекулярно-генетических подтипов). В эксперименте соотношение нейтрофилов к опухолевым клеткам составляло 10:1. Эксперимент проводился с аутологичными и гетерологичными нейтрофилами. Для оценки функциональной активности нейтрофилов их инкубировали с опухолевыми клетками при 37°C. Показателями функциональной активности нейтрофилов в нашей работе служили лизосомальная активность, НСТ- тест и способность нейтрофилов формировать внеклеточные сети. Для определения активности лизосомального аппарата нейтрофилов 0,1 мл взвеси исследуемого материала (чистую фракцию нейтрофилов с активатором) 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 полуколичественное содержание лизосом в нейтрофилах (обозначения: «+++» - при заполнении лизосомальными гранулами всей цитоплазмы нейтрофила, «++» - наполовину заполненная лизосомами цитоплазма клетки, «+» - наличие в цитоплазме единичных лизосом). При отсутствии лизосом клетка считалась «нулевой». Для подсчета индекса суммарной люминесценции лизосом (ИСЛЛ), выраженного в условных единицах, использовали:

$$\text{ИСЛЛ} = A \times 1 + B \times 3 + C \times 10 + D \times 0,$$

Где А, В, С, D – количество клеток с заполнением цитоплазмы лизосомальными гранулами на «+», «++», «+++» или с их отсутствием соответственно [53].

Оценка внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови в суспензии с линией клеток RD (рабдомиосаркома,



происхождение: человек) и с линией опухолевых клеток HEp-2 (происхождение: человек, эпидермоидная карцинома гортани, клон HEp-2) с помощью НСТ-теста.

Постановку НСТ- теста осуществляли в модификации А.Н. Маянского и М.К. Виксмана. В пробирки с 0,1 мл взвеси нейтрофилов, выделенных из периферической крови, добавляли 0,05 мл 0,2 % раствора НСТ в 0,1 мл фосфатного буфера. Смесь инкубировали 30 мин при 37°C. Пробирки центрифугировали, из осадка готовили мазки, фиксировали этанолом, окрашивали 0,1 % раствора сафранина в течение 5 мин и учитывали интенсивность спонтанной НСТ – восстанавливающей активности. Для определения числа индуцированных НСТ – положительных клеток параллельно в каждую пробирку со взвесью клеток вносили по 0,1 мл взвеси монодисперсного полистирольного латекса диаметром 1,7 мкм (концентрация  $10^8$  частиц/мл) или заранее подготовленные суточные культуры контрольных штаммов разных микроорганизмов, доведенные до концентрации 1 млрд микробных тел в 1,0 мл (по стандарту мутности БАК-10, «Ормет») и разведенные в 10 раз. В пробирке с 0,1 мл взвеси активированных нейтрофилов добавляли 0,05 мл 0.2 % раствора НСТ в 0.1 мл фосфатного буфера. Смесь инкубировали 30 минут при 37°C. Пробирки центрифугировали, из осадка готовили мазки, которые фиксировали этанолом, окрашивали 0,1 % раствором сафранина в течение 5 мин. При учете реакции определяли процент НСТ – позитивных клеток и учитывали интенсивность реакции по формуле:

$$\text{Интенсивность НСТ} = \frac{Ax3+Bx2+Cx1}{100},$$

где А, В, С – число клеток, соответственно, с отложением диформаза, превышающим размеры ядра, занимающим более 1/3 площади цитоплазмы и менее 1/3 площади соответственно. Кроме того, рассчитывали функциональный резерв нейтрофилов, который определяли, как частное от деления числа индуцированных на чисто спонтанных НСТ – положительных клеток (либо как разницу между числом индуцированных и спонтанных НСТ – положительных клеток

Изучение внеклеточного механизма защиты нейтрофильных гранулоцитов, а именно способности к формированию сетей внеклеточной ДНК проводилось в динамике (через 1, 3, 6, 24 часа). Чистая фракция нейтрофилов, в концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл, инкубировали в присутствии активатора (линии клеток RD (рабдомиосаркома, происхождение: человек) и линии клеток HEp-2 (эпидермоидная карцинома гортани, происхождение: человек)) из расчета 10 нейтрофилов на 1 опухолевую клетку. В качестве контроля использовали

чистую фракцию интактных нейтрофилов, инкубированных в тех же условиях, взвесь опухолевых клеток линии RD (рабдомиосаркома, происхождение: человек) и Нер-2 (эпидермоидная карцинома гортани, происхождение: человек). Изучение образования внеклеточных ловушек проводили при инкубации нейтрофилов в физиологическом растворе и с индукторами – опухолевыми клетками клеточных линий и полученными от пациентов [Долгушин, И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева, А.Ю. Савочкина. – Москва: Изд-во РАМН, 2009. – 208 с]. Взвеси опухолевых клеток Нер2 и RD в концентрации  $1 \cdot 10^5$  кл/мл помещались в стерильные чашки Петри и смешивали в соотношении 1:50 с чистой фракцией нейтрофилов, выделенных из периферической крови здоровых доноров. Полученные взвеси инкубировали в термостате при 37°C в течение 60 минут. Затем из полученных взвесей изготавливались мазки на предметных стеклах. Для обнаружения в фиксированных препаратах внеклеточных ловушек, образованных нейтрофилами чистой фракции, был использован флюоресцентный краситель - 0,002 % раствор Sytox Green, который предназначен для верификации внеклеточной ДНК и ДНК погибших клеток, которые при люминесцентной микроскопии имеют ярко-зеленый цвет. Учет результатов проводили при помощи люминесцентной микроскопии, используя фильтры, обеспечивающие возбуждающий свет с длиной волны не более 490 нм и эмиссию с длинной волны 520 нм. Такой способ окраски позволил произвести количественную оценку образования ловушек, так как хорошо визуализировалась морфология нейтрофилов и внеклеточно расположенные нити ДНК. При данном способе окраски проводили учет процентного содержания нейтрофилов с сегментированным ядром, с недифференцированным ядром и нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Также для обнаружения в фиксированных препаратах внеклеточных ловушек, образованных нейтрофилами чистой фракции, использовалось окрашивание по Романовскому-Гимзе с микроскопией в световом микроскопе с дифференцированием форм лейкоцитов и подсчетом внеклеточной ДНК. Подсчет вели на 300 структурах (нейтрофилы сегментоядерные, нейтрофилы юные, сети ДНК свободнолежащие, сети ДНК в непосредственном контакте с опухолевыми клетками).

В работах Савочкиной А.Ю. [Савочкина, А.Ю. Влияние факторов свертывания крови на образование внеклеточных нейтрофильных ловушек / А.Ю. Савочкина, Э.Н. Мякишева, О.Б. Прокопьева // Рос. иммунологический журн. – 2015. – №2. – С. 94-96] доказано, что для нейтрофилов чистой фракции

такие методы окраски определения нейтрофильных внеклеточных ловушек в фиксированных и нативных препаратах, как акридиновый оранжевый, Sytox Green и Романовский –Гимзе, могут быть равнозначно использованы в зависимости от имеющегося в лаборатории оборудования и наличия красителей.

Для идентификации внеклеточных сетей ДНК нейтрофилов использовали иммуноцитохимический метод окраски на миелопероксидазу. Взвеси клеток опухоли, инкубированные с чистой фракцией нейтрофилов при 37°C в течение 60 минут, помещали в центрифугу «Thermo Scientific Cytospin 4» для изготовления цитологических мазков. Затем стекла с мазками подвергались демаскировке антигенов в водяной бане с использованием цитратного буфера с рН 6,1 при температуре 97°C в течении 15 минут. Далее стекла загружались в автостейнер «Dako AutostainerLink48» для проведения иммуноцитохимической реакции со стандартизированными протоколами. После этого производилась дополнительная окраска гематоксилином и заключение срезов под пленку в мультитейнере «Sakura Tissue-Tek Prisma+Film».

Для изучения эффекта воздействия внешнего фактора на формирования внеклеточных сетей ДНК нейтрофилами при инкубации с перевиваемыми клеточными линиями изучалось влияние электромагнитных излучений природного и техногенного происхождения на опухолевые клетки перевиваемых клеточных линий и чистую фракцию нейтрофилов с помощью метода моделирования микроволнового излучения, аналогичного Солнечному и техногенному. Исследование проводилось с помощью устройства «АИМТ-1» [Вдовина, Н.В. Устройство моделирования микроволнового излучения Солнца СВЧ диапазона для оценки его модифицирующего действия на организмы / Н.В. Вдовина, Н.Н. Гудаев, В.Н. Багаев, С.Н. Даровских, Е.П. Попечителей, Е.В. Водяницкий // Вестник ЮУрГУ. Серия: Компьютерные технологии, управление, радиоэлектроника. – 2015. – Том 15. -№1. –С. 5-10] моделирования микроволнового излучения, аналогичного Солнечному и техногенному, в диапазоне частот (4,0 – 4,3) ГГц, разработанного учеными Южно-Уральского государственного университета. Это устройство позволяет генерировать различные виды спектров микроволнового излучения, аналогичного Солнечному, с управляемой интенсивностью (от 10 до 100) мкВт/ см<sup>2</sup> и шириной спектра (от 6 до 30) МГц. Кроме того, с помощью этого прибора возможно моделировать аналог электромагнитного излучения (ЭМИ) техногенного происхождения, представляющий собой моночастотное излучение в указанном выше диапазоне частот с интенсивностью, не превышающей 100 мкВт/ см<sup>2</sup>.

Взвеси опухолевых клеток Her2 и RD инкубировали с чистой фракцией нейтрофилов, выделенной из периферической крови здоровых доноров, подвергались воздействию моделированного ЭМИ, аналогичного Солнечному и моделированному ЭМИ, аналогичному техногенному. Воздействие каждого вида излучения осуществлялось в течение 16 минут на расстоянии 15 см от объекта при температуре 22°C. Затем из полученных взвесей изготавливались мазки с изучением нейтрофильных внеклеточных ловушек по описанной ранее методике и определением численности популяции опухолевых клеток. Подсчет клеток велся в абсолютных числах в 10 полях зрения.

Для изучения ультраструктуры поверхности клеток, изучаемых перевиваемых клеточных линий Her2 и RD, а также нейтрофильных гранулоцитов при воздействии моделированного ЭМИ использовалась сканирующая электронная микроскопия с помощью растрового электронного микроскопа высокого разрешения JSM-6460 LV (JEOL, Япония) по стандартной методике.

Статистические методы. Статистический анализ результатов исследования медико-социального портрета пациенток проводили с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics 21. Сравнение качественных признаков проводилось с помощью таблиц сопряженности (хи-квадрат по методу Пирсона). Если ожидаемые значения после составления таблиц сопряженности при сопоставлении качественных признаков не превышали 5, то их сравнение проводилось с помощью точного критерия Фишера попарно. Разница считалась значимой при  $p < 0,05$ . При статистической обработке результатов морфологической и иммунологической исследований проверка гипотезы о нормальности распределения проводилось с помощью критерия Шапиро-Уилка. Обработка количественных признаков производилось методом описательной статистики. Данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения представлены средним значением и стандартным отклонением. Данные которые не подчинялись нормальному закону распределения представлены медианой и квартильным размахом. При сравнении выборок генеральной совокупности в преобладающем большинстве случаев хотя бы одна из групп сравнения не подчинялись нормальному закону распределения, поэтому при их сравнении пользовались методом непараметрической статистики с использованием критерия Манна-Уитни, используя программный пакет Biostat 2011, программу Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении медико-социального портрета обследуемых пациенток, женщины с инвазивными карциномами неспецифического типа молочной железы более злокачественной и прогностически худшей формы чаще искусственно прерывали беременность, у них чаще наблюдались самопроизвольные прерывания беременности. Пациентки с инвазивными карциномами молочной железы неспецифического типа низкой степени злокачественности чаще болели сахарным диабетом 2 типа, а также заболеваниями сердечно-сосудистой системы, а пациентки с инвазивными карциномами молочной железы неспецифического типа умеренной и высокой степени злокачественности чаще были подвержены аллергическим реакциям на лекарственные препараты в анамнезе. В целом, обращает на себя внимание наибольшая коморбидная отягощенность пациенток прогностически благоприятной группы с инвазивными карциномами молочной железы люминального типа А.

При анализе полученных данных оказалось, что количество интратуморальных лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль в зонах сплошного опухолевого роста, достоверно прямо пропорционально связано с общим уровнем лимфоидной инфильтрации опухоли, а наиболее плотная лимфоидная инфильтрация окружает зоны активного опухолевого роста («горячие точки»). CD8 позитивные лимфоциты инфильтрата вокруг опухолевых клеток в зонах активного роста карциномы молочной железы в большем количестве наблюдаются в высоко злокачественных опухолях (таблица 1,2). Так, в опухолях с люминальным типом А, в центральных зонах медиана значений исследуемого показателя была 15 [14:16], а преобладающее количество значений в опухолях тройного негативного типа с базальным фенотипом находилась в квартильном размахе от 164,75 до 174. Подобная тенденция различий инфильтрации стромы опухолей CD8 позитивными лимфоцитами в зависимости от молекулярно-генетического типа опухолей обнаружена также при изучении зон активного опухолевого роста и дистантных зон. Субпопуляции цитотоксических CD8 позитивных лимфоцитов преобладают в зонах активного опухолевого роста – перитуморальной зоне над хелперами/индукторами CD4 - позитивными клетками. В зависимости от нарастания степени злокачественности опухолей, увеличивается численность субпопуляции как хелперов/индукторов CD4 - позитивных клеток, так и цитотоксических CD8-позитивных клеток, в большей степени накапливаясь в перитуморальной зоне опухоли вокруг зон активного опухолевого роста на периферии опухоли, по сравнению с интратуморальными зонами. В

центральных зонах сплошного опухолевого роста численность CD4+ и CD8+ лимфоцитов была значительно меньше, чем в зонах активного опухолевого роста. В центральных зонах опухолей и зонах активного опухолевого роста (перитуморальных), CD8 позитивные лимфоциты преобладают над CD4 позитивными, в то время как в дистантных зонах опухолей, сохраняется преобладание CD4 позитивных лимфоцитов в опухолях с люминальным типом А, В HER2 позитивном и В HER2 негативном. В высоко злокачественных опухолях HER2 позитивном, нелюминальном, тройном негативном с базальным и небазальным фенотипом соотношение хелперов/индукторов CD4 - позитивных клеток и цитотоксических CD8-позитивных клеток выравнивается и достоверно не различается.

CD4 позитивные и CD8 позитивные лимфоциты достигают максимальных значений в полиморфно-клеточном инфильтрате стромы карцином именно в зонах активного опухолевого роста (перитуморальных) в наиболее неблагоприятном типе инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа тройном негативном типе с базальным фенотипом и составляли 477 [467,75:501,25] и 1193,5 [1159,5:1222,25] клеток. Максимальных значений в полиморфно-клеточном инфильтрате стромы карцином CD4 – позитивные и CD8-позитивные лимфоциты достигают именно в зонах активного опухолевого роста (перитуморальных) в наиболее неблагоприятном типе инвазивных карцином молочной железы неспецифического типа тройном негативном типе с базальным фенотипом и составляют 477 [467,75:501,25] и 1193,5 [1159,5:1222,25] клеток.

Установлено, что с увеличением степени злокачественности новообразования количество естественных киллеров (NK-клеток, CD56 - позитивных) снижается, как в интратуморальной, так и в перитуморальной зонах. Причем наиболее выраженное уменьшение представительства этих клеток отмечено нами в перитуморальной зоне. В инвазивных карциномах молочной железы люминального типа А плотность инфильтрации естественными киллерами интратуморальной и перитуморальной зон одинакова и превышает таковую в дистантной зоне. В карциномах молочной железы люминального типа В, HER2 негативного наблюдается такая же картина. В карциномах люминального типа В HER2 позитивного при тенденции к уменьшению плотности инфильтрации во всех зонах, большинство клеток располагаются в интратуморальной зоне, а зоны активного опухолевого роста (перитуморальная) и дистантная статистически не различаются по величине данного показателя. В нелюминальных карциномах молочной железы HER2 позитивном типе содержание натуральных киллеров в полиморфно-

клеточном инфильтрате всех исследуемых зон, сохраняя тенденцию к уменьшению, становится на одном уровне и составляет 32 [30:34], 36 [34:38] и 35 [34:36] соответственно. В дистантных зонах инвазивных карцином неспецифического типа люминального типа А и В, HER2 позитивного и негативного негативного статистически значимых различий в плотности инфильтрации NK-клетками не регистрируется. Вместе с тем для этих вариантов карциномы характерно максимальное содержание CD56+ клеток в инфильтрате всех исследуемых зон. Самое малое количество естественных киллеров в перитуморальном инфильтрате мы обнаружили в опухолях с тройным негативным фенотипом, которое статистически значимо отличается от такового показателя во всех предыдущих типах. В зависимости от степени злокачественности и молекулярно-генетического подтипа опухоли в дистантных зонах наблюдается тенденция к уменьшению численности естественных киллеров в лимфоидном инфильтрате от G1 к G3.

При исследовании CD20 и CD79 позитивного В-лимфоцитарного компонента полиморфно-клеточного инфильтрата всех исследуемых зон установлено увеличение уровня представительства этих клеток в зависимости от роста степени злокачественности опухоли с установлением максимума в опухолях с тройным негативным типом, базальным фенотипом. При сравнительной характеристике выраженности полиморфноклеточного инфильтрата в изучаемых зонах выявлено, что в перитуморальной зоне преобладают В-лимфоциты (CD20-позитивные), иногда с тенденцией к образованию фолликулоподобных структур без герминативных центров. В непосредственной близости к опухолевой ткани (перитуморальная зона) плотность клеточного инфильтрата в опухолевых узлах расценивается нами как высокая и прямо пропорционально уменьшается по ходу удаления от опухолевых разрастаний (таблицы 1,2).

Таблица 1 – Структура воспалительно-клеточного инфильтрата в различных зонах исследования в карциномах молочной железы в зависимости от молекулярно-биологического профиля опухолей. М [Q1:Q2]. Критерий статистического анализа – Манна-Уитни

Молекулярно-генетический подтип	Люминальный тип А (n=100)			Люминальный тип В, HER2 негативный (n=108)			Люминальный тип В, HER2 позитивный (n=120)		
	ИЗО	ПЗО	ДЗ	ИЗО	ПЗО	ДЗ	ИЗО	ПЗО	ДЗ
CD4 (клон 4B12)	<b>1</b> 15 [14:16] p <sub>1,1,1,4</sub> =0,000 p <sub>1,1,1,7</sub> =0,000 p <sub>1,1,1,10</sub> =0,000 p <sub>1,1,1,13</sub> =0,000 p <sub>1,1,1,16</sub> =0,000	<b>2</b> 46 [44:47,25] p <sub>1,2,1,5</sub> =0,000 p <sub>1,2,1,8</sub> =0,000 p <sub>1,2,1,11</sub> =0,000 p <sub>1,2,1,14</sub> =0,000 p <sub>1,2,1,17</sub> =0,000	<b>3</b> 27 [26:28] p <sub>1,3,1,6</sub> =0,000 p <sub>1,3,1,9</sub> =0,000 p <sub>1,3,1,12</sub> =0,000 p <sub>1,3,1,15</sub> =0,000 p <sub>1,3,1,18</sub> =0,000	<b>4</b> 74 [71:77]	<b>5</b> 166 [162:170]	<b>6</b> 38,5 [35:40,25]	<b>7</b> 111,5 [110:114]	<b>8</b> 226 [214,75: 236]	<b>9</b> 44 [41:47]
CD8 (клон C8/144B)	<b>2</b> 37 [35:39] p <sub>2,1,2,4</sub> =0,000 p <sub>2,1,2,7</sub> =0,000 p <sub>2,1,2,10</sub> =0,000 p <sub>2,1,2,13</sub> =0,000 p <sub>2,1,2,16</sub> =0,000	<b>143</b> [139:150] p <sub>2,2,2,5</sub> =0,000 p <sub>2,2,2,8</sub> =0,000 p <sub>2,2,2,11</sub> =0,000 p <sub>2,2,2,14</sub> =0,000 p <sub>2,2,2,17</sub> =0,000	<b>18</b> [17:19] p <sub>2,3,2,6</sub> =0,000 p <sub>2,3,2,9</sub> =0,000 p <sub>2,3,2,12</sub> =0,000 p <sub>2,3,2,15</sub> =0,000 p <sub>2,3,2,18</sub> =0,000	104 [98: 109,25]	299 [283:318,5]	26 [25:27]	250,5 [247:255]	1003,5 [965,75: 1050,75]	22 [21:23]
CD56 (клон 123C3)	<b>3</b> 50 [52,25:58] p <sub>3,1,3,4</sub> =0,000 p <sub>3,1,3,7</sub> =0,000 p <sub>3,1,3,10</sub> =0,000 p <sub>3,1,3,13</sub> =0,000 p <sub>3,1,3,16</sub> =0,000	<b>54</b> [52:56] p <sub>3,2,3,5</sub> =0,000 p <sub>3,2,3,8</sub> =0,000 p <sub>3,2,3,11</sub> =0,000 p <sub>3,2,3,14</sub> =0,000 p <sub>3,2,3,17</sub> =0,000	<b>37</b> [35:39,25] p <sub>3,3,3,6</sub> =0,96 p <sub>3,3,3,9</sub> =0,80 p <sub>3,3,3,12</sub> =0,000 p <sub>3,3,3,15</sub> =0,000 p <sub>3,3,3,18</sub> =0,000	48 [45:51]	52 [49:54,25]	37 [35:39]	41 [40:43]	35 [33:37]	33 [32:34]
CD20 (клон L26)	<b>4</b> 14 [13:15] p <sub>4,1,4,4</sub> =0,000 p <sub>4,1,4,7</sub> =0,000 p <sub>4,1,4,10</sub> =0,000 p <sub>4,1,4,13</sub> =0,000 p <sub>4,1,4,16</sub> =0,000	<b>50</b> [48:52] p <sub>4,2,4,5</sub> =0,000 p <sub>4,2,4,8</sub> =0,000 p <sub>4,2,4,11</sub> =0,000 p <sub>4,2,4,14</sub> =0,000 p <sub>4,2,4,17</sub> =0,000	<b>46</b> [44:48] p <sub>4,3,4,6</sub> =0,000 p <sub>4,3,4,9</sub> =0,000 p <sub>4,3,4,12</sub> =0,000 p <sub>4,3,4,15</sub> =0,000 p <sub>4,3,4,18</sub> =0,000	49 [47:51,25]	151 [149:155]	43 [41:44]	117 [112,75: 121]	186 [179:190]	58 [55:61]



Продолжение таблицы 1

Нейтрофилы	5	9 [9:9] P <sub>5,1:5,4</sub> =0,000 P <sub>5,1:5,7</sub> =0,000 P <sub>5,1:3,10</sub> =0,000 P <sub>5,1:5,13</sub> =0,000 P <sub>5,1:5,16</sub> =0,000	16[15:17] P <sub>5,2:5,5</sub> =0,000 P <sub>5,2:5,8</sub> =0,000 P <sub>5,2:5,11</sub> =0,000 P <sub>5,2:5,14</sub> =0,000 P <sub>5,2:5,17</sub> =0,000	2 [2:2] P <sub>5,3:5,6</sub> =0,000 P <sub>5,3:5,9</sub> =0,000 P <sub>5,3:5,12</sub> =0,000 P <sub>5,3:5,15</sub> =0,000 P <sub>5,3:5,18</sub> =0,000	23 [22:24]	59 [58:60]	3 [3:3]	38 [36:40]	82 [79:85]	5 [5:5]			
											CD79 (клон JCB117)	6	8 [5:8] P <sub>6,1:6,4</sub> =0,000 P <sub>6,1:6,7</sub> =0,000 P <sub>6,1:6,10</sub> =0,000 P <sub>6,1:6,13</sub> =0,000 P <sub>6,1:6,16</sub> =0,000
Молекулярно-генетический подтип	HER2 позитивный тип, нелюминальный (n=106)	Тройной негативный тип с базальным фенотипом (n=72)									Тройной негативный тип без базального фенотипа (n=49)		
		ИЗО	ПЗО	ДЗ	ИЗО	ПЗО	ДЗ	ИЗО	ПЗО	ДЗ	ИЗО	ПЗО	ДЗ
CD4 (клон 4B12)	1	135 [127,5:139]	187 [179:193]	46 [44:48]	170 [164,75:174]	477 [467,75:501,25]	58 [57:59]	138 [134:142]	244 [240:252]	49 [47:51]			
CD8 (клон C8/144B)	2	136 [131:141]	553,5 [534:578,75]	44 [43:45]	199 [193:208]	1193,5 [1159,5:1222,25]	61,5 [60:65]	179 [172:187]	772 [746:797]	48 [46:50]			
CD56 (клон 123C3)	3	32 [30:34]	36 [34:38]	35 [34:36]	21 [21:21]	20 [19:21]	28 [25:31]	23 [22:24]	25 [23:27]	31 [30:333]			
CD20 (клон L26)	4	117 [112:120]	215 [209:219]	54 [52:56]	154 [148:159]	400 [389:409,5]	81 [79:83]	163 [156:168]	355 [348:366]	76 [74:78]			
Нейтрофилы	6	34 [33:35]	76 [74:78]	2 [2:2]	59 [57:61]	93,5 [91:97,25]	6 [6:6]	57 [55:59]	77 [74:80]	5 [4:6]			
CD79 (клон JCB117)	5	14 [12:15]	35 [32:37]	6 [5:7]	23 [18:25]	46 [43:48]	7 [6:8]	19 [16:23]	37 [34:42]	6 [5:7]			

Таблица 2 – Структура воспалительно-клеточного инфильтрата в различных зонах исследования в карциномах молочной железы в зависимости от степени злокачественности опухоли (Grade). M [Q1:Q2]. Критерий статистического анализа – Манна-Уитни

Молекулярно-генетический подтип	G1 (n=100)			G2 (n=227)			G3 (n=228)		
	ИЗО	ПЗО	ДЗ	ИЗО	ПЗО	ДЗ	ИЗО	ПЗО	ДЗ
CD4 (clone 4B12)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	15 [14;16]	46 [44;47,25]	27 [26;28]	109 [74;112]	206 [166;226]	41 [39;44]	138 [131,75;160]	235,5 [187;465,25]	49 [46;56]
	p <sub>1,1,1,4</sub> =0,000 p <sub>1,1,1,7</sub> =0,000	p <sub>1,2,1,5</sub> =0,000 p <sub>1,2,1,8</sub> =0,000	p <sub>1,3,1,6</sub> =0,000 p <sub>1,3,1,9</sub> =0,000						
CD8 (clone C8/144B)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	37 [35;39]	143 [139;150]	18 [17;19]	244 [104;251]	908 [299;1006]	23 [22;25]	168 [137;193,25]	741 [557;1156]	46 [44;49]
	p <sub>2,1,2,4</sub> =0,000 p <sub>2,1,2,7</sub> =0,000	p <sub>2,2,2,5</sub> =0,000 p <sub>2,2,2,8</sub> =0,000	p <sub>2,3,2,6</sub> =0,000 p <sub>2,3,2,9</sub> =0,000						
CD56 (clone 123C3)	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	50 [48;52,25]	54 [52;56]	37 [35;39,25]	44 [41;48]	38 [35;52]	35 [33;37]	24,5 [21;32]	27 [21;35]	33 [29,75;35]
	p <sub>3,1,3,4</sub> =0,000 p <sub>3,1,3,7</sub> =0,000	p <sub>3,2,3,5</sub> =0,000 p <sub>3,2,3,8</sub> =0,000	p <sub>3,3,3,6</sub> =0,000 p <sub>3,3,3,9</sub> =0,000						
CD20 (clone L26)	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	13 [13;15]	50 [48;52]	46 [44;48]	109 [49;117,5]	175 [152;186]	53 [43;58]	145 [117;157]	345 [215;388]	74 [54,75;79]
	p <sub>4,1,4,4</sub> =0,000 p <sub>4,1,4,7</sub> =0,000	p <sub>4,2,4,5</sub> =0,000 p <sub>4,2,4,8</sub> =0,000	p <sub>4,3,4,6</sub> =0,000 p <sub>4,3,4,9</sub> =0,000						
Нейтрофилы зрелые, сегментоядерные формы	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	9 [9;9]	16 [15;17]	2 [2;2]	35 [23;38]	76 [59;82]	5 [3;5]	54 [34;58]	79 [75;90,25]	4 [2;6]
	p <sub>5,1,5,4</sub> =0,000 p <sub>5,1,5,7</sub> =0,000	p <sub>5,2,5,5</sub> =0,000 p <sub>5,2,5,8</sub> =0,000	p <sub>5,3,5,6</sub> =0,000 p <sub>5,3,5,9</sub> =0,000						
CD79 (клон JCB117)	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	6 [5;8]	14 [11;15]	3 [2;4]	8 [5;15]	17 [15;22]	4 [3;5]	16 [13,75;22]	38 [34;43,25]	6 [5;7]
	p <sub>6,1,6,4</sub> =0,000 p <sub>6,1,6,7</sub> =0,000	p <sub>6,2,6,5</sub> =0,000 p <sub>6,2,6,8</sub> =0,000	p <sub>6,3,6,6</sub> =0,000 p <sub>6,3,6,9</sub> =0,000						

ИЗО – интралимфатическая зона опухоли

ПЗО – перитуморальная зона опухоли

ДЗ – дистантная зона

В дистантной зоне при наиболее агрессивных новообразованиях с тройным негативным фенотипом, плотность содержания В-лимфоцитов и при базальных и небазальных формах, статистически значимо выше, в сравнении с одноименным параметром в других группах исследования.

При исследовании инфильтрации нейтрофилами изучаемых зон опухоли (центральной, перитуморальной и дистантной) обнаружено, что минимальное содержание в инфильтрате данного типа клеток наблюдается в наиболее благоприятном типе опухолей – группе люминального типа А. Максимальное представительство нейтрофилов наблюдается в наиболее агрессивных опухолях тройного негативного типа с базальным фенотипом, а также в карциномах молочной железы люминального типа В HER2 позитивного, также весьма агрессивной по течению. Группу со средними значениями плотности инфильтрации нейтрофилами представляют опухоли люминальной группы В HER2 позитивные и нелюминальные карциномы – HER2 позитивные и тройные негативные без базального фенотипа.

В результате проведенного исследования, в мазках-отпечатках инвазивных карцином молочной железы мы обнаружили, что среди групп живых опухолевых клеток и клеток воспалительного инфильтрата (окраска: синька Эванса и краситель Sytox Green), у которых ядра окрашены в зеленый цвет, а цитоплазма в оранжевый, располагаются мертвые клетки, зеленого цвета, а также свободнолежащие ярко-зеленые волокна, представляющие собой нити ДНК нейтрофила (нейтрофильные внеклеточные ловушки). При этом сети ДНК распространялись именно из клеток с сегментированным ядром, имеющих морфологические признаки нейтрофилов. Таким образом, мы доказали, что внеклеточные сети в воспалительном интратуморальном и перитуморальном инфильтрате – ядерного происхождения (нити ДНК), предположительно из гранулоцитов.

Целью следующего этапа исследования явилось доказательство того, что именно нейтрофил активируется и погибает путем формирования внеклеточной ловушки при встрече с опухолевой клеткой, реализуя один из механизмов клеточной гибели – нетоз. Нетоз - особая форму клеточной гибели, при котором происходит конденсация хроматина и фрагментация ядра без разрыва оболочек ядра и вакуолей, органеллы в цитоплазме остаются целыми в отличие от апоптоза и некроза. Исследование функциональной активности нейтрофилов и процессов формирования ими сетей внеклеточной ДНК при инкубации с опухолевыми клетками перевиваемых клеточных линий НЕР-2 (человек, эпидермоидная карцинома гортани) и RD (человек, рабдомиосаркома) *in vitro*.

При анализе результатов мы выявили, что нейтрофилы при инкубации с опухолевыми клетками клеточных линий НЕР-2 (человек, эпидермоидная

карцинома гортани) и RD (человек, рабдомиосаркома) активируются и через 60 мин инкубации выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – нейтрофильные внеклеточные сети ДНК (таблица 3).

Таблица 3 – Интенсивность образования нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК при встрече с опухолевыми клетками (n=20) М (Q1:Q2). Критерий статистического анализа - Манна – Уитни.

		Нейтрофилы периферической крови, чистая фракция	Суспензия опухоли НEr2 + нейтрофилы периферической крови, чистая фракция	Суспензия опухоли RD + нейтрофилы периферической крови, чистая фракция
		1	2	3
Через 1 час наблюдений				
Нейтрофилы, юные формы	1	4,0 (4,0:4,25) p <sub>1,1:1,2</sub> =0,96	4,0 (4,0;4,0) p <sub>1,2:1,3</sub> =0,96	4,0 (3,0;5,0) p <sub>1,1:1,3</sub> =0,49
Нейтрофилы зрелые, сегментоядерные формы	2	294,5 (294,0:295,0) p <sub>2,1:2,2</sub> =0,000	257,0 (255,75:258,0) p <sub>2,2:2,3</sub> =0,000	283,0 (283,0:283,0) p <sub>2,1:2,3</sub> =0,000
Внеклеточные сети	3	1,0 (1,0:2,0) p <sub>3,1:3,2</sub> =0,000	39,0 (39,0:40,0) p <sub>3,2:3,3</sub> =0,000	13,0 (12,0;14,0) p <sub>3,1:3,3</sub> =0,000
Через 3 часа наблюдений				
Нейтрофилы, юные формы	4	4,0 (3,75:5,0) p <sub>4,1:4,2</sub> =0,99	4,0 (4,0:4,0) p <sub>4,2:4,3</sub> =0,77	4,0 (3,0:4,0) p <sub>4,1:4,3</sub> =0,99
Нейтрофилы зрелые, сегментоядерные формы	5	294,0 (293,75:295,0) p <sub>5,1:5,2</sub> =0,000	90,0 (90,0:91,0) p <sub>5,2:5,3</sub> =0,000	224,0 (223,0:226,0) p <sub>5,1:5,3</sub> =0,000
Внеклеточные сети	6	2,0 (1,0:2,0) p <sub>6,1:6,2</sub> =0,000	206,0 (205,0:206,0) p <sub>6,2:6,3</sub> =0,000	73,0 (70,0:74,0) p <sub>5,1:5,3</sub> =0,000
Через 6 часов наблюдений				
Нейтрофилы, юные формы	7	4,0 (4,0:5,0) p <sub>7,1:7,2</sub> =0,000	0 p <sub>7,2:7,3</sub> =0,000	4,0 (3,5:5,0) p <sub>7,1:7,3</sub> =0,27

Продолжение таблицы 3

Нейтрофилы зрелые, сегментоядерные формы	8	293,0 (293,0:293,5) $p_{8,1:8,2}=0,000$	0 $p_{8,2:8,3}=0,000$	54,0 (50,0:55,0) $p_{8,1:8,3}=0,000$
Внеклеточные сети	9	2,0 (2,0:2,5) $p_{9,1:9,2}=0,000$	300,0 (300,0:300,0) $p_{9,2:9,3}=0,000$	243,0 (240,5:245,5) $p_{9,1:9,3}=0,000$
Через 24 часа наблюдений				
Нейтрофилы, юные формы	7	4,0 [3,75:5,0] $p_{7,1:7,2}=0,000$	0 $p_{7,2:7,3}=0,000$	0 $p_{7,1:7,3}=0,27$
Нейтрофилы зрелые, сегментоядерные формы	8	293,0 [292,25:293,75] $p_{8,1:8,2}=0,000$	0 $p_{8,2:8,3}=0,000$	0 $p_{8,1:8,3}=0,000$
Внеклеточные сети	9	3,0 [2,25:3,75] $p_{9,1:9,2}=0,000$	300,0 [300,0:300,0] $p_{9,2:9,3}=0,000$	243,0 [240,5:245,5] $p_{9,1:9,3}=0,000$

Установлено, что нейтрофильные гранулоциты либо имеют сохраненную структуру, либо у них частично разрушена мембрана клеток и вместо сегментированного ядра ДНК представлено «клубком» из сетеподобных структур. Через 6 часов наблюдений в микропрепаратах среди опухолевых клеток рабдомиосаркомы обнаруживается «густая» сеть из внеклеточной ДНК. В контрольных образцах нейтрофильные гранулоциты сохраняют структуру и жизнеспособность, и формируют от 1 [1,0:2,0] до 3 [2,25:3,75] внеклеточных сетей ДНК. К 6 часам совместной с нейтрофилами инкубации в группе с использованием активатора – перевиваемой клеточной линии эпидермоидной карциномы гортани (клон НЕР2) сегментоядерные нейтрофилы с неизменной морфологией не выявляются, а в группе с использованием активатора – перевиваемой клеточной линии рабдомиосаркомы (клон RD) выявляются как сегментоядерные формы в количестве 54,0 [50,0:55,0], так и нейтрофильные внеклеточные ловушки - 243,0 [240,5:245,5]. Полностью отсутствуют во всех полях зрения нейтрофильные гранулоциты с сегментированным ядром при инкубации с клетками рабдомиосаркомы только через 24 часа наблюдений. Но, несмотря на различное время, требующееся для активации нейтрофильных гранулоцитов с формированием внеклеточных сетей ДНК, в обеих группах исследования в результате совместного инкубирования нейтрофилов и опухолевых клеток при температуре 37°C в течение 60 минут мы определили,

что в нейтрофильных гранулоцитах значительно усиливался кислородзависимый метаболизм (НСТ-тест) и показатели лизосомальной активности. Количество лизосом в цитоплазме нейтрофилов, отражающее их функциональную активность и способность к реагированию на внешние воздействия увеличивается по сравнению с контрольными пробами. Значительно, почти в два раза, увеличиваются и показатели НСТ-теста в опытных образцах (индуцированный НСТ-тест) 1,14 [1,13:1,14], не изменяясь в контрольных 0,27 [0,26:0,27]. Таким образом нейтрофильный гранулоцит при инкубации с опухолевой клеткой перевиваемых клеточных линий эпидермоидной карциномы гортани (линия Нер-2), рабдомиосаркомы (линия клеток RD) активируется (доказывается резким возрастанием показателей лизосомальной активности и НСТ теста) и реализует неспецифический характер реагирования – нетоз (формирование нейтрофильной внеклеточной ловушки) (рисунок 1).

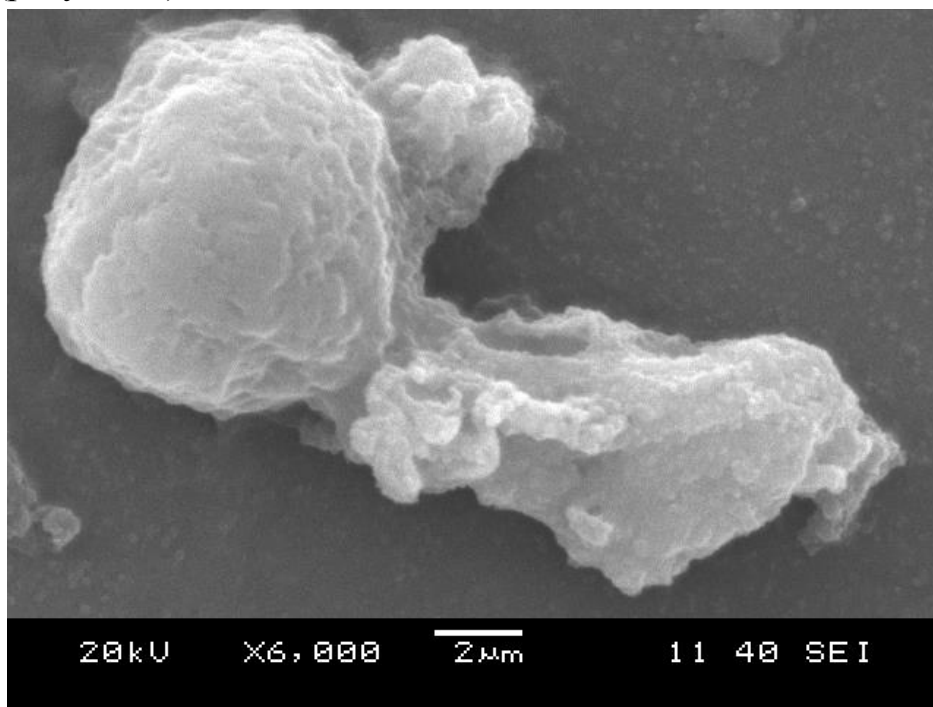


Рисунок 1 – Внеклеточные сети ДНК нейтрофила охватывают опухолевую клетку. Сканирующая электронная микроскопия, нативный препарат;  $\times 6000$

Для уточнения механизмов процессов формирования нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК в ткани опухоли был проведен следующий этап исследования. Оказалось, что гетерологичные нейтрофильные гранулоциты при инкубации 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. Они либо располагаются вблизи, либо оплетают опухолевые клетки, в то время как в контрольных образцах нейтрофилы сохраняют структуру и жизнеспособность, и не формируют внеклеточных сетей ДНК (таблица 4).

Для того, чтобы установить, является ли индукция нетоза аутологичными нейтрофильными гранулоцитами реакцией на инкубацию с опухолевыми клетками инвазивной карциномы молочной железы, нами высказано предположение: формируя внеклеточные сети ДНК на клетки перевиваемых клеточных линий HEp-2, RD, нейтрофилы могут не образовывать их на «собственные» опухолевые клетки. Но аутологичные нейтрофилы, по сравнению с гетерологичными нейтрофилами здоровых доноров, более активно в большем количестве формируют сети вблизи опухолевых клеток.

Таблица 4 – Сравнительная характеристика интенсивности образования аутологичными и гетерологичными нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК при встрече с опухолевыми клетками (n=20). M [Q1:Q2]. Критерий статистического анализа - Манна – Уитни.

		Аутологичные нейтрофилы периферической крови + суспензия опухолевых	Гетерологичные нейтрофилы периферической крови + суспензия опухолевых клеток	Нейтрофилы периферической крови (контрольная группа)
		1	2	3
Нейтрофилы, юные формы	1	3 [3:4] $p_{1,1:1,2}=0,0294$	4 [3,75:4] $p_{1,2:1,3}=0,0026$	5,0 [4,0:5,0] $p_{1,1:3,1}=0,0001$
Нейтрофилы зрелые, сегментоядерные формы	2	271 [269:274] $p_{2,1:2,2}=0,000$	278 [275,75:279,25] $p_{2,2:2,3}=0,000$	294 [293:294] $p_{2,1:2,3}=0,000$
Внеклеточные сети ДНК, лежащие свободно	3	21 [19:22,25] $p_{3,1:3,2}=0,0002$	15,5 [14,75:18] $p_{3,2:3,3}=0,000$	1,0 [1,0:2,0] $p_{3,1:3,3}=0,000$
Внеклеточные сети ДНК, оплетающие опухолевые клетки	4	4 [4:5] $p_{4,1:4,2}=0,000$	2 [1,75;3,0]	

Активация нейтрофилов подтвердилась определением показателя лизосомальной активности и показателя кислородзависимого метаболизма.

Количество лизосом в цитоплазме нейтрофилов, отражающее их функциональную активность и способность к реагированию на внешние воздействия увеличивается по сравнению с контрольными пробами. Результаты НСТ-теста при индукции нейтрофилов пациента его опухолевыми клетками статистически значимо выше, чем в случае индукции нейтрофильных гранулоцитов доноров.

Интерес для исследования представляло сравнение интенсивности образования сетей внеклеточной ДНК аутологичными нейтрофилам при инкубации с клетками инвазивных карциномах молочной железы неспецифического типа разной степени злокачественности (таблица 5). При анализе полученных данных, обращает на себя внимание, что через 6 часов инкубации в период, когда большинство нейтрофильных ловушек сформировано, нейтрофильные гранулоциты с неизменной морфологией присутствуют во всех группах исследования, численно, безусловно преобладая в группе низко злокачественных карцином молочной железы. Наименьшее их представительство наблюдается в тех случаях, когда в роли активатора используются клетки карцином молочной железы высокой степени злокачественности. В группе с активатором – клетками высоко злокачественных карцином молочной железы, через 6 часов наблюдения большая часть гранулоцитов находится либо уже в состоянии ловушки, либо на этапе ее выброса, статистически значимо преобладая над прочими группами исследования. Нами отмечена одна важная особенность - внеклеточная ДНК нейтрофилов в высоко злокачественных опухолях в большей своей части располагается непосредственно вблизи опухолевых клеток, оплетая их, отграничивая друг от друга, или наоборот сближая опухолевые клетки между собой. Даже в тех клетках, которые находятся на стадии выброса ДНК из клетки, их нити, длинные и ветвистые направлены в сторону опухолевых клеток, либо уже сформированных конгломератов из сетей и опухолевых клеток. Если в вышеописанных группах поведение нейтрофильных гранулоцитов в целом отражает тенденцию, то в группе умеренно злокачественных карцином сохраняется около трети неизмененных клеток 102 [100:103,75], 17% свободнолежащих сетей ДНК 51 [48:56,75] и 48% клеток формируют направленные ловушки, что составляет 146 [140,5:149].

При сравнительной характеристике формирования нейтрофильной внеклеточной ДНК при инкубации с аутологичными клетками карциномы молочной железы различного молекулярно-генетического подтипа нами выявлено различное количество сетеподобных структур и нейтрофилов с



неизменной структурой, и мы предположили, что не только синтез, но и скорость образования внеклеточных ловушек зависит от клетки-активатора. Так выявлено, что при инкубации опухолевых клеток карцином люминального типа А с нейтрофильными гранулоцитами доноров, количество внеклеточных сетей ДНК, сформированных ими преобладало над таковыми в группе исследования карцином люминального типа В, HER2 негативного, но было значительно меньше агрессивных форм нелюминальных карцином (тройной негативный тип и HER2 позитивный тип, нелюминальный) (таблица 5).

Таблица 5 – Интенсивность образования нейтрофильных внеклеточных ловушек при инкубации с опухолевыми клетками через 6 часов при различных молекулярно-генетических типах карцином молочной железы (суспензия опухоли пациента + нейтрофилы периферической крови) (n = 20). М [Q1:Q2]. Критерий статистического анализа - Манна – Уитни.

		Люминальный тип А	Люминальный тип В HER2 негативный	Люминальный тип В HER2 позитивный	HER2 позитивный тип, нелюминальн	Тройной негативный тип, базальный фенотип
		1	2	3	4	5
Нейтрофилы, юные формы	1	4 [3:5]	2 [2:3]	3 [3:3]	3 [3:4]	2 [1,5:2,5]
Нейтрофилы зрелые, сегментоядерные формы	2	280 [278,5:281]	283 [282:288]	274 [273:280]	266 [265:267,5]	255 [251:261]
Внеклеточные сети ДНК	3	17 [15:18] P <sub>3,1:3,2</sub> =0,0017 P <sub>3,1:3,3</sub> =0,0028 P <sub>3,1:3,4</sub> =0,000 P <sub>3,1:3,5</sub> =0,000	15 [9,5:16] P <sub>3,2:3,3</sub> =0,000 P <sub>3,2:3,4</sub> =0,000 P <sub>3,2:3,5</sub> =0,000	23 [17:24] P <sub>3,3:3,4</sub> =0,000 P <sub>3,3:3,5</sub> =0,000	31 [28,5:32,5] P <sub>3,4:3,5</sub> =0,00	42 [38:46,5]

Как видно из таблицы, все опухолевые клетки карцином молочной железы любого молекулярно-генетического типа явились клетками-активаторами, но

клетки клинически более агрессивных форм показывают максимальные значения исследуемого показателя. Тем не менее, хотя карциномы люминального типа В, HER2 негативного являются клинически более агрессивными, по сравнению с карциномами люминального типа А, данные типы опухолей имеют примерно одинаковую способность при встрече с нейтрофильными гранулоцитами активировать их и запускать процессы нетоза. В то время, как уменьшение экспрессии на клетках рецепторов к прогестерону (люминальный тип В, HER2 позитивный), наличие гиперэкспрессии HER2 (тройной негативный тип, нелюминальный), а также приближение к базальноклеточной дифференцировке (тройной негативный тип) демонстрирует нам значительно более выраженную способность к активации нейтрофилов.

Нами предложен способ определения внеклеточной ДНК в мазке отпечатке карциномы молочной железы, как дополнительный критерий степени злокачественности опухоли, с целью объективизация прижизненного определения патогистологической злокачественности карцином молочной железы в патологоанатомической практике. Разработан и предложен дополнительный критерий определения степени злокачественности карциномы молочной железы, путем оценки количества внеклеточных сетей ДНК в мазках отпечатках с опухоли из операционного материала при срочном гистологическом исследовании. Одним из общепринятых критериев злокачественности карцином молочной железы - является ядерный полиморфизм. В ходе срочного интраоперационного гистологического исследования при окраске замороженных срезов оптически для световой микроскопии представляется сложным достоверно определить данный критерий, большое значение имеет масса факторов (температура в помещении, в криостате, квалификация лаборанта, необходимость быстро выполнять манипуляцию и др.). Нефиксированные ткани с выраженной интенсивностью воспринимают ядерные красители, что часто приводит к «перекрашиванию» срезов и ошибочному суждению о повышенных ядерной плотности и ядерного полиморфизма. В ходе исследования выявлена прямая зависимость между количеством внеклеточных сетей ДНК и степенью злокачественности карциномы молочной железы (таблица 6).

Критерии оценки условно выражены в баллах. Положительными эффектами заявляемого критерия является то, что при рутинном исследовании появляется дополнительный критерий определения степени злокачественности карциномы молочной железы. Предлагаемый критерий позволяет детализировать и объективизировать общепринятые подходы к оценке степени злокачественности карцином молочной железы, полуколичественно оценить

внеклеточные сети ДНК в воспалительном инфильтрате в карциномах молочной железы, более точно определить степень злокачественности карциномы молочной железы, а полуколичественная оценка позволяет сравнивать результаты исследования биоптатов от одного больного, взятых в различные временные периоды, и от разных пациентов.

Таблица 6 – Сравнительная характеристика содержания внеклеточных сетей ДНК в мазках - отпечатках карцином молочной железы различной степени злокачественности (n=24). M [Q1:Q2]. Критерий статистического анализа - Манна – Уитни.

	Карцинома молочной железы низкой степени злокачественности, G1	Карцинома молочной железы умеренной степени злокачественности, G2	Карцинома молочной железы высокой степени злокачественности, G3
	1	2	3
Внеклеточные сети ДНК	2,0 [1,0:2,0] p <sub>1:1</sub> =0,000	6,0 [5,0:6,0] p <sub>2:3</sub> =0,000	24 [22:25] p <sub>1:3</sub> =0,000

Изготавливается мазок-отпечаток с рассеченной по центру опухоли в секторе, либо в молочной железе в послеоперационном материале на предметных стеклах и окрашивается по Романовскому-Гимзе с микроскопией в световом микроскопе при увеличении в 400 раз с подсчетом внеклеточной ДНК. Подсчет ведется на 10 полей зрения. Оцениваются как свободнолежащие нити ДНК, так и в контакте с опухолевыми клетками. При изготовлении мазка-отпечатка предметное стекло прикладывают на протяжении всей опухоли, начиная с макроскопически оцениваемой периферии опухоли, где находятся зоны активного роста опухоли и максимально сосредоточен лейкоцитарный инфильтрат.

Предлагаемый способ осуществляется следующим образом. Оценивается количество внеклеточных сетей ДНК в 10 полях зрения.

1 балл (G1) – менее 2 внеклеточных сетей ДНК

2 балла (G2) – 3-10 внеклеточных сетей ДНК

3 балла (G3) – 11 и более внеклеточных сетей ДНК

Таким образом, применение предлагаемого дополнительного диагностического критерия определения степени злокачественности карциномы молочной железы, путем оценки количества внеклеточных сетей ДНК в мазках отпечатках с опухоли из операционного материала обеспечивает

достоверную верификацию патологического процесса, позволяет ускорить выдачу результата гистологического исследования и оптимизировать лечебно-диагностический процесс.

Следующим этапом явилось исследование жизнеспособности и особенностей межклеточных взаимодействий между перевиваемыми клеточными линиями и нейтрофильными гранулоцитами под влиянием моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения Солнца в диапазоне частот (4,0-4,3) ГГц электромагнитного излучения и моделированного техногенного излучения на частоте 4,1 ГГц. Данные виды излучения были выбраны с целью анализа межклеточных взаимодействий между нейтрофильными гранулоцитами и опухолевыми клетками. Они не являются повреждающими для нейтрофильных гранулоцитов, но могут обладать повреждающим действием на опухолевые клетки различной степени выраженности. Установлено, что опухолевые клетки линии НЕр-2 в контрольной группе сохраняют морфологию и жизнеспособность на протяжении всего исследования (24 часов), через 24 часа инкубации в питательной среде при комнатной температуре их количество увеличивается более чем в 10 раз. Клетки располагаются гроздьями по 6 – 10, парами, одиночно. При истечении времени (16 минут) воздействия на опухолевые клетки моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения природного и техногенного происхождения зафиксировано появление клеток с различной морфологией: большая часть клеток уменьшается в размерах, уплотняются ядра. Опухолевые клетки линий НЕр-2 после воздействия моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения техногенного происхождения через 24 часа культивирования в питательной среде сохраняют жизнеспособность, восстанавливая численность популяции, и формируют клеточные ассоциации. Опухолевые клетки линий НЕр-2 после воздействия моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения природного происхождения через 24 часа не восстанавливают численность клеточной популяции в питательной среде, визуализируются единичные клетки, которые значительно уменьшены в размерах, располагаются одиночно, имеют признаки кариорексиса и кариолизиса. При совместной инкубации опухолевых клеток линии НЕр и нейтрофильных гранулоцитов вне зависимости от вида, воздействующего на них моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения или без него, наблюдается нетоз нейтрофильных гранулоцитов. Под действием техногенного излучения нити внеклеточной ДНК утолщены, без разветвлений и короткие, в то время как при природном излучении они выглядят в виде длинных, ветвистых и тонких структур. Опухолевые клетки находятся во внеклеточных сетях ДНК нейтрофила.

Воздействие моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения на чистую фракцию нейтрофильных гранулоцитов периферической крови как природного, так и техногенного происхождения не влияет на способность формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек. При воздействии моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения природного происхождения на инкубируемые совместно нейтрофильные гранулоциты и опухолевые клетки, статистически значимо ниже количественный показатель формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек, по сравнению с контрольной группой и опытной группой под воздействием техногенного моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения. Вероятно, это связано именно с повреждающим действием моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения природного происхождения на опухолевые клетки эпидермоидной карциномы гортани. Тем не менее, в ассоциации с нейтрофильными гранулоцитами, после воздействия как природного моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения, так и техногенного моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения большинство опухолевых клеток разрушается в меньшем количестве и в нейтрофильных внеклеточных сетях сохраняют свою морфологию.

Через 24 часа наблюдения численность популяции опухолевых клеток линии HEp-2 при совместной инкубации с нейтрофильными гранулоцитами в условиях моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения различного генеза уже сопоставима с контрольными показателями. Опухолевые клетки линии RD в питательной среде без воздействия (контроль) сохраняют жизнеспособность на протяжении всего исследования (24 часов), и максимума увеличений популяции достигают к 24 часам исследования в питательной среде при комнатной температуре более чем в 30 раз, формируя симпласты различного диаметра, составом от 30 до 300 клеток, также небольшими группами, редко одиночные клетки. После воздействия на опухолевые клетки линий RD моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения техногенного происхождения зарегистрировано изменение их морфологии. В прежде мономорфной популяции наряду с неизменными клетками появляются клетки с различной морфологией. Большая часть клеток уменьшается в размерах, уплотняются ядра, наряду с этим каждая пятая клетка (1:5) имеет признаки кариорексиса и кариолизиса, разрушения мембраны (некрозы), клетки образуют некрупные ассоциации не более 5 клеток или лежат одиночно.

Через 24 часа после действия моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения техногенного происхождения популяция

опухолевых клеток линии RD восстанавливается и количественно сопоставима с контрольными показателями. При действии на опухолевые клетки моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения природного происхождения наряду с клетками, сохранившими свою морфологию, встречаются некротизированные субстанции. Через 24 часа после действия моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения природного происхождения линия RD, за счет сохранивших жизнеспособность клеток, восстанавливает численный клеточный состав и становится сопоставима с контрольной группой. Нейтрофильные гранулоциты при взаимодействии с перевиваемыми клеточными линиями RD без воздействия моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения формируют нейтрофильные внеклеточные ловушки, охватывая опухолевые клетки и сближая их друг с другом. Нейтрофильные гранулоциты при взаимодействии с перевиваемыми клеточными линиями RD в условиях воздействия моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения как техногенного, так и природного происхождения формируют нейтрофильные внеклеточные ловушки. Через 6 часов совместной инкубации опухолевых клеток и нейтрофилов наряду с сетеподобными структурами визуализируются сегментоядерные формы нейтрофилов со стабильной мембраной. Количество сформированных нейтрофильных внеклеточных ловушек в группе, подвергшейся воздействию моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения, аналогичному техногенному статистически значимо меньше, по сравнению с контрольной группой и опытной, подвергшейся воздействию моделированного низкоинтенсивного микроволнового излучения, аналогичному природному. Полученные результаты позволяют утверждать, что при инкубации с неповрежденной опухолевой клеткой нейтрофил активируется, чтобы любым способом оказать цитотоксическое действие, которое реализуется путем нетоза. Так, в тех группах исследования, в которых моделированное низкоинтенсивное микроволновое излучение, аналогичное природному или техногенному, оказывают наиболее повреждающее действие на клетки, обнаружено статистически значимо меньшее количество сформированных нейтрофильных внеклеточных ловушек на период – 6 часов наблюдений (таблица 7).

Таблица 7 – Содержание внеклеточных сетей ДНК и сегментоядерных нейтрофилов после 6 часов совместной инкубации с опухолевыми клетками линии НЕР-2, %, n=20. М (Q1:Q2). Критерий статистического анализа - Манна – Уитни

Морфологические типы, ассоциации		П. ЭМИ		Т. ЭМИ		Без воздействия (контроль)	
		НЕР-2 + Нейтрофилы	Нейтрофилы	НЕР-2 + Нейтрофилы	Нейтрофилы	НЕР-2 + Нейтрофилы	Нейтрофилы
		1	2	3	4	5	6
Нейтрофилы сегментоядерные	1	51,0 [45:51]	297,0 [295,5: 298,5]	21,0 [18: 21,75]	297,0 [297: 300]	18,0 [15:21]	297,0 [294: 300]
Внеклеточные сети ДНК нейтрофилов	2	249,0 [249: 255] p <sub>2,1,2,3</sub> = 0,000	3,0 [1,5: 4,5] p <sub>2,2,2,4</sub> = 0,5075	279,0 [278,25: 282] p <sub>2,3,2,5</sub> = 0,1677	3,0 [0:3] p <sub>2,4,2,6</sub> = 0,4249	282,0 [279: 285] p <sub>2,1,2,5</sub> = 0,000	3,0 [0:6] p <sub>2,2,2,6</sub> = 0,7868

Примечание: П. ЭМИ – моделированное электромагнитное излучение природного происхождения; Т. ЭМИ – моделированное электромагнитное излучение техногенного происхождения.

В литературе имеются данные о том, что существуют различные фракции нейтрофильных гранулоцитов, которые по-разному могут реагировать на различные индукторы, а также вероятно на опухолевые клетки различного происхождения [Савченко А.А. Особенности взаимосвязи фенотипа и хемилюменесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком почки / А.А. Савченко, А.Г. Борисов, А.А. Модестов и др.// Медицинская иммунология. – 2016. - Т. 18. - №3. - стр. 259-268; Badora-Rybicka A. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio before chemotherapy as potential prognostic factors in patients with newly diagnosed epithelial ovarian cancer / A. Badora-Rybicka, E. Nowara, D. Starzyczny-Słota// DOI: 10.1136/esmoopen-2016-000039 Published 31 March 2016]. Предпринимаются попытки оценить прогностическую роль нейтрофильных гранулоцитов, ассоциированных с лимфоцитами при раке молочной железы [Ethier J.L. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer: a systematic review and meta-analysis/ J.L. Ethier, D. Desautels, A. Templeton et al // Breast Cancer Research. - 2017. – 19:2: <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0794-1>].

С учетом результатов нашего исследования, полагаем, что нейтрофильные гранулоциты оказывают этапное действие на опухолевые клетки. Первый этап – противоопухолевое действие, формирование

внеклеточных сетей ДНК нейтрофилами при инкубации с опухолевыми клетками и появление ассоциативного комплекса – опухолевая клетка или их группа, окруженная нейтрофильной внеклеточной ловушкой с целью реализации защитной функции – уничтожения опухолевой клетки. Второй этап – через посредство нейтрофильной внеклеточной ДНК включение механизмов «уклонения» или экранирования опухолевой клетки от эффекторных противоопухолевых механизмов иммунной системы, ведущих к реализации проопухолевого действия.

Перспектива дальнейшей разработки темы.

На сегодняшний день уже созданы и создаются новые лекарственные препараты и схемы лечения, разрушающие либо блокирующие связи между опухолевой клеткой и лимфоцитом на молекулярном уровне для того, чтобы иммунокомпетентные клетки обнаруживали перед собой потенциальный объект для уничтожения и, привлекая киллинговые клеточные элементы, уничтожали опухоль, запускали в новообразовании процессы апоптоза либо некроз. Изучение особенностей противоопухолевого иммунитета, новых свойств иммунокомпетентных клеток и механизмов «уклонения» или экранирования опухолевых клеток открывает перспективы для разработки прогноза заболевания, создания схем лечения для максимального преодоления блокады иммунокомпетентных клеток.

## **ВЫВОДЫ**

1. Повышение числа самопроизвольных и искусственных прерываний беременности в анамнезе у пациенток с инвазивными карциномами молочной железы неспецифического типа выявлено у женщин с более злокачественной и прогностически худшей формой течения заболевания. Пациентки с инвазивными карциномами молочной железы неспецифического типа низкой степени злокачественности чаще болели сахарным диабетом 2 типа, а также заболеваниями сердечно-сосудистой системы.
2. Чем выше степень злокачественности инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, тем выраженнее плотность полиморфно-клеточной инфильтрация перитуморальной, интратуморальной и дистантной зон с накоплением в них преимущественно CD8 позитивных лимфоцитов, а также CD4 позитивных Т лимфоцитов, нейтрофилов, CD20 и CD79 позитивных лимфоцитов, в то время как количество естественных киллеров (CD56 позитивных клеток) с ростом злокачественности опухоли уменьшается.
3. Нейтрофильный гранулоцит при встрече с опухолевой клеткой активируется и реализует неспецифический характер реагирования – нетоз (формирование



внеклеточных сетей дезоксирибонуклеиновой кислоты). На этапе первичного контакта опухолевой клетки и нейтрофила биологический смысл формирования внеклеточных сетей дезоксирибонуклеиновой кислоты заключается в попытке реализации неспецифического киллингового эффекта, то есть противоопухолевого действия.

4. Механизм образования нейтрофильных внеклеточных ловушек обладает определенной специфичностью, и в случае взаимодействия с аутологичных нейтрофилов с опухолевыми клетками они активируются значительно быстрее с более ранним формированием внеклеточных сетей дезоксирибонуклеиновой кислоты.
5. Нейтрофилы наиболее интенсивно и быстро формируют внеклеточные сети дезоксирибонуклеиновой кислоты в инвазивных карциномах молочной железы неспецифического типа G 3, по сравнению с G 1, в большей своей части располагаясь непосредственно вблизи опухолевых клеток.
6. Инвазивные карциномы молочной железы неспецифического типа с иммунофенотипами: люминальный тип B, HER2 позитивный, HER2 позитивный тип нелюминальный, тройной негативный тип с базальноклеточной дифференцировкой демонстрируют значительно более выраженную способность к активации нейтрофилов с формированием внеклеточных ловушек.
7. Моделированные электромагнитные излучения природного и техногенного происхождения оказывают альтеративный эффект на опухолевые клетки перевиваемых клеточных линий и не повреждают нейтрофильные гранулоциты в *in vitro* комплексе «опухолевая клетка – нейтрофил».
8. Формирование внеклеточных сетей дезоксирибонуклеиновой кислоты нейтрофильным гранулоцитом и как результат ассоциативный комплекс – опухолевая клетка или группа их, окруженная внеклеточными сетями дезоксирибонуклеиновой кислоты - является одним из механизмов «уклонения» или экранирования опухолевой клетки от эффекторных противоопухолевых механизмов иммунной системы.
9. Применение оценки количества внеклеточных сетей дезоксирибонуклеиновой кислоты в мазках отпечатках с опухоли из операционного материала, как дополнительного диагностического критерия определения степени злокачественности инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, обеспечивает более достоверную верификацию патологического процесса, позволяет ускорить выдачу результата гистологического исследования и оптимизировать лечебно-диагностический процесс.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Разработанный и предложенный дополнительный критерий определения степени злокачественности инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, путем оценки количества внеклеточных сетей ДНК в мазках отпечатках с опухоли из операционного материала при срочном гистологическом исследовании рекомендуется использовать в рутинной патоморфологической практике в ГБУЗ «ЧОКЦОиЯМ», ГБУЗ «ЧОПАБ».

Изготавливается мазок-отпечаток с рассеченной по центру опухоли в секторе, либо в молочной железе в послеоперационном материале на предметных стеклах и окрашивается по Романовскому-Гимзе с микроскопией в световом микроскопе при увеличении в 400 раз с подсчетом внеклеточной ДНК. Подсчет ведется на 10 полей зрения. Оцениваются как свободнолежащие нити ДНК, так и в контакте с опухолевыми клетками. При изготовлении мазка-отпечатка предметное стекло прикладывают на протяжении всей опухоли, начиная с макроскопически оцениваемой периферии опухоли, где находятся зоны активного роста опухоли и максимально сосредоточен лейкоцитарный инфильтрат.

Оценивается количество внеклеточных сетей ДНК в 10 полях зрения.

1 балл (G1) – менее 2 внеклеточных сетей ДНК.

2 балла (G2) – 3-10 внеклеточных сетей ДНК.

3 балла (G3) – 11 и более внеклеточных сетей ДНК.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Долгушин, И.И. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети ДНК сдерживают рост опухолевых клеток / И.И. Долгушин, Ю.С. Шишкова, А.Б. Семенова и др. // Российский иммунологический журнал. — 2013. — Т. 7 (16), № 2–3. — С. 130.
2. Dolgushin, I.I. Neutrophil extracellular DNA networks restrain growth of tumor cells / I.I. Dolgushin, Y.S. Shishkova, A.B. Semenova et al. // Internationaler Medizinischer Kongress «Moderne Aspekte der Prophylaxe, behandlung und rehabilitation» (Hannover, 4-5 June 2013). – Hannover, 2013. – P. 62-63.
3. Долгушин, И.И. Взгляд на роль нейтрофильной внеклеточной ДНК, как компонента микроокружения опухоли, в процессах канцерогенеза / И.И. Долгушин, Шишкова Ю.С., Семенова А.Б. и др. // Уральский медицинский журнал. — 2014. — № 02 (116). — С. 19-22.
4. Казачков, Е.Л. Особенности лимфоцитарного состава микроокружения опухоли при местнораспространенном плоскоклеточном раке гортани различных степеней дифференцировки / Е.Л. Казачков, А.Ю. Шаманова, А.Б. Семенова // Актуальные вопросы патологоанатомической практики:

материалы научно-практической патологоанатомической конференции Южного Урала с участием патологоанатомов других регионов России и СНГ, посвященной 30-летию основания Челябинского областного патологоанатомического бюро / под ред. Е.Л. Казачкова. – Челябинск, 2014. – С. 33-35.

5. Долгушин, И.И. Специфичность формирования нейтрофильных внеклеточных сетей ДНК в карциномах молочной железы / И.И. Долгушин, А.Б. Семенова, А.В. Важенин// Евразийский онкологический журнал. – 2014. - №3(03). – С.259-260.
6. Dolgushin, I.I. View on the role of neutrophil extracellular DNA as a component of the tumor microenvironment, in carcinogenesis / I.I. Dolgushin, Y.S. Shishkova, A.B. Semenova et al.// Internationaler Medizinischer Kongress «Moderne Aspekte der Prophylaxe, behandlung und rehabilitation» (Hannover, 5 — 6 June 2014). – Hannover, 2014. – P. 31–33.
7. Казачков, Е.Л. «Эффект миграции» лимфоцитов параканкрозной зоны в местнораспространенных плоскоклеточных карциномах гортани высокой степени дифференцировки (G1) /Е.Л. Казачков, А.Ю. Шаманова, А.Б. Семенова // Евразийский онкологический журнал. –2014. – № 3 (03). – С. 209. – Тез. VIII съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии.
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, А.Ю. Шаманова и др. // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9, № 5. – С. 132–135.
9. Семенова, А.Б. Молекулярно-генетическое исследование. Особенности амплификации гена HER2/NEU методом FISH (флюоресцентная in situ гибридизация) при прямом подсчете количества сигналов в ядрах опухолевых клеток при раке молочной железы у пациентов в Челябинской области за 2012-2013 год /А.Б. Семенова, А.Ю. Шаманова, Ямс Л.В. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в ядерной медицине»; 2014; Челябинск, Россия.
10. Шаманова, А.Ю. Характеристика Т-лимфоцитарного компонента воспалительного инфильтрата параканкрозной зоны в местнораспространенных плоскоклеточных карциномах гортани высокой степени дифференцировки (G1) / А.Ю. Шаманова, А.Б. Семенова// Материалы V международной (XII итоговой) научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 70-летию ЮУГМУ. – Челябинск, 2014. – С. 171–173.

11. Семенова, А.Б. Оценка образований нейтрофильных внеклеточных сетей ДНК при раке молочной железы различной степени злокачественности / А.Б. Семенова // Конференция молодых ученых «Инновационные технологии в диагностике и лечении злокачественных опухолей»; 17-18 октября 2014; Челябинск, Россия.
12. Семенова, А.Б. Микроокружение инвазивных карцином молочной железы «неспецифического» и «специфических» типов с учетом злокачественности новообразований / А.Б. Семенова, А.Ю. Шаманова // Уральский медицинский журнал. – 2014. – № 08 (122). – С. 23–28.
13. Семенова, А.Б. Процессы формирования аутологичными нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы молочной железы в зависимости от степени злокачественности и рецепторного статуса опухоли / А.Б. Семенова, А.Ю. Шаманова, Ю.С. Шишкова // Уральский медицинский журнал. – 2014. – № 08 (122). – С. 29-32.
14. Семенова, А.Б. Структурные особенности воспалительно-клеточного инфильтрата в параканкрозной и дистантной зонах инвазивных карцином неспецифического типа молочной железы различных степеней злокачественности / А.Б. Семенова, Е.Л. Казачков, А.Ю. Шаманова // Уральский медицинский журнал. – 2014. – № 08 (122). – С. 33–36.
15. Казачков, Е.Л. Сосуды и лимфоцитарный инфильтрат как компоненты микроокружения опухоли при местно распространенном раке гортани / Е.Л. Казачков, А.Ю. Шаманова, А.Б. Семенова // Уральский медицинский журнал. – 2014. – № 08 (122). – С. 62-64.
16. Казачков, Е.Л. Нейтрофильные гранулоциты как компонент параканкрозного микроокружения карциномы гортани / Е.Л. Казачков, А.Ю. Шаманова, А.Б. Семенова и др. // Актуальные вопросы патологической анатомии: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию образования кафедры патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета. – Новосибирск, 2015. – С. 174–176.
17. Долгушин, И.И. Структурные особенности процессов формирования нейтрофильными гранулоцитами сетей внеклеточной ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы гортани / И.И. Долгушин, А.Ю. Шаманова, А.Б. Семенова // Уральский медицинский журнал. – 2015. – № 9 (132). – С. 119-122.
18. Казачков, Е.Л. Особенности клеточного и стромально-сосудистого компонентов параканкрозной зоны карцином гортани различной степени дифференцировки / Е.Л. Казачков, А.Ю. Шаманова, А.Б. Семенова и др. // Уральский медицинский журнал. – 2016. – № 3 (136). – С. 40-44.

19. Долгушин, И.И. Нейтрофильные гранулоциты защищают перевиваемые опухолевые клетки рабдомиосаркомы (клон линии RD) от влияния электромагнитных излучений / И.И. Долгушин, Ю.С. Шишкова, А.Б. Семенова и др. // Российский иммунологический журнал. – 2016. – №2-10(19). – С. 152-159.
20. Семенова, А.Б. Функциональный ответ и образование сетей внеклеточной ДНК нейтрофилами периферической крови при взаимодействии с клетками перевиваемых линий опухолевых клеток HER-2 (человек, эпидермоидная карцинома гортани) и RD (человек, рабдомиосаркома) в условиях электромагнитного излучения, аналогичного солнечному и техногенному / А.Б. Семенова, Ю.С. Шишкова, И.И. Долгушин и др. // II Всероссийская научно-практическая конференция «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека; 2016 Март18-19; Челябинск, Россия.
21. Даровских, С.Н. Влияние моделированных электромагнитных излучений природного и техногенного происхождения на опухолевые клетки линии HER-2 in vitro / С.Н. Даровских, И.И. Долгушин, Ю.С. Шишкова и др. // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2016. – №10. – С. 46-52.
22. Семенова, А.Б. Зависимость индекса пролиферативной активности Ki67 от процессов формирования аутологичными нейтрофилами внеклеточных сетей ДНК при контакте с элементами карциномы молочной железы люминального типа В / А.Б. Семенова, Е.Л. Казачков, И.И. Долгушин и др. // Уральский Медицинский Журнал. – 2016. – №03(136). – С. 68-71.
23. Semenova, A.B. Neutrophil extracellular DNA networks to limit the peripheral tumour cell proliferation / A.B. Semenova, I.I. Dolgushin, Y.S. Shishkova et al. // Virchows Archiv. – 2016. – №1 (469) – P. S9. (Из списка Web of Science, Scopus (входит в ядро РИНЦ)).
24. Семенова, А.Б. Воспалительно-клеточный инфильтрат в опухоли и параканкротной зоне при инвазивных карциномах молочной железы с неблагоприятным клиническим прогнозом (HER2-позитивный и тройной негативный типы новообразования) / А.Б. Семенова, Е.Л. Казачков, И.И. Долгушин и др. // Уральский Медицинский Журнал. – 2016. – №03(136). – С. 64-67.
25. Семенова, А.Б. Формирование нейтрофильными гранулоцитами сетей внеклеточной ДНК как дополнительный диагностический критерий степени злокачественности карцином молочной железы / А.Б. Семенова, Е.Л. Казачков, И.И. Долгушин и др. // Уральский Медицинский Журнал. – 2016. – №03(136). – С. 72-76.
26. Казачков, Е.Л. Морфологическая характеристика элементов микроокружения карцином гортани различной степени дифференцировки /

- Е.Л. Казачков, А.Ю. Шаманова, И.И. Долгушин и др. // Актуальные вопросы патологоанатомической практики: материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека» / под ред. Е.Л. Казачкова. – Челябинск, 2016. – С. 123-126.
27. Казачков, Е.Л. Структурная характеристика сосуристо-волокнутого компартмента демаркационного микроокружения карциномы гортани при её комбинированном лечении / Е.Л. Казачков, А.Ю. Шаманова, А.Б. Семенова и др. // Уральский медицинский журнал. – 2017. – № 4 (148). – С. 46-50.
28. Казачков, Е.Л. Комплексная прижизненная морфологическая диагностика карциномы гортани. Е. Л. Казачков, А. Ю. Шаманова, А. Б. Семенова [и др.]. Учебно-методическое пособие. Челябинск. 2017. 55с.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ – артериальная гипертензия  
 АФК – активные формы кислорода  
 БНДП – болезни нижних дыхательных путей  
 ДЗ – дистантная зона  
 ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота  
 ИБС – ишемическая болезнь сердца  
 ИЗО – интратуморальная зона опухоли  
 ПЗО – перитуморальная зона опухоли  
 Карцинома G1, grade 1 – карцинома низкой степени злокачественности  
 Карцинома G2, grade 2 – карцинома умеренной степени злокачественности  
 Карцинома G3, grade 3 – карцинома высокой степени злокачественности  
 Клон HEP-2 – перевиваемая клеточная линия опухолевых клеток; человек, эпидермоидная карцинома гортани  
 Клон RD – перевиваемая клеточная линия опухолевых клеток; человек, рабдомиосаркома  
 НАДФН+-оксидаза – никотинамидадениндинуклеотидфосфат – зависимая оксидаза  
 НВЛ (Neutrophil Extracellular Traps, NETs) - нейтрофильная внеклеточная ловушка  
 РНК – рибонуклеиновая кислота  
 СД – сахарный диабет  
 FOXP3 – транскрипционный фактор развития и функционирования регуляторных Т-клеток, член семейства FOX-белков  
 HER2 – рецептор тирозин-протеин киназы erb-2, кодируемый ERBB2 геном  
 ТИЛ-фактор (tumor infiltrating lymphocytes) – лимфоциты, инфильтрирующие опухоль

**Семенова  
Анна Борисовна**

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО  
КОМПОНЕНТА МИКРООКРУЖЕНИЯ КАРЦИНОМ МОЛОЧНОЙ  
ЖЕЛЕЗЫ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ И  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОДТИПОВ**

14.03.02 – патологическая анатомия  
14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Курган – 2018

Подписано в печать 06.12.17.  
Формат 60 × 84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Усл. печ. л. 2,0.  
Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman сур.  
Печать лазерная. Тираж 100 экз. Заказ № 2520/18.

Отпечатано в ПЦ «ПРИНТМЕД» (ИП Шарифулин Р. Г.)  
454080, г. Челябинск, ул. Энтузиастов, 25а. Тел. +7 351 230-67-37. E-mail: rinmed@mail.ru