

## ФЕНОТИП ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ НЕОПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ

Абакумова Т.В.<sup>1</sup>, Генинг Т.П.<sup>1</sup>, Долгова Д.Р.<sup>1</sup>, Антонеева И.И.<sup>1,2</sup>,  
Песков А.Б.<sup>1</sup>, Генинг С.О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

<sup>2</sup> ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

**Резюме.** На сегодня отсутствует единая точка зрения на роль циркулирующих нейтрофилов (Нф) в механизмах возникновения и развития неоплазмы. Считается, что вследствие высокой функциональной пластичности они могут проявлять как про-, так и противоопухолевую активность. С целью изучения фенотипа Нф на различных стадиях неоплазии шейки матки оценивали абсолютное и относительное их количество, активность миелопероксидазы, показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста, уровень катионных белков. В лизате Нф и сыворотке крови оценивали спонтанную продукцию эластазы и активных форм матриксных металлопротеиназ, уровень IL-2, IL-8, IL-18, IFN $\gamma$ , G-CSF. Образование внеклеточных ловушек (NET) оценивали с суточной культурой *Saccharomyces cerevisiae* в качестве индуктора. Обследована 31 пациентка с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (CIN) и 21 первичная больная раком шейки матки (РШМ) Ia стадии по FIGO, а также 25 практически здоровых женщин. Установлена повышенная по сравнению с нормой спонтанная и индуцированная кислородзависимая цитолитическая и фагоцитарная активность и спонтанная продукция NET на фоне снижения абсолютного количества Нф у пациенток с CIN, что позволяет предполагать их противоопухолевую активность. Уже на стадии дисплазии как в Нф, так и в плазме крови возрастают по сравнению с нормой уровни «проопухолевых» цитокинов, MMP-9, IL-2 и G-CSF. Высокие уровни в плазме крови регуляторного IFN $\gamma$  и праймирующего активацию нейтрофилов IL-8 не предполагают использования на стадии дисплазии шейки матки экзогенных стимуляторов активности Нф. На начальной стадии РШМ значимо по сравнению с нормой увеличено абсолютное количество Нф. Однако на фоне повышенной спонтанной кислородзависимой цитолитической активности у них значимо снижена активность фагоцитоза и резко повышена спонтанная продукция NET, что в целом характерно для «проопухолевого» фенотипа Нф. В Нф и плазме крови больных РШМ Ia сохраняется повышенным уровень IL-2 и продолжает возрастать уровень MMP-9. Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать изменение фенотипа Нф при переходе от дисплазии к РШМ в сторону увеличения проопухолевых клеток низкой плотности. Полученные результаты позволили разработать алгоритм обследования женщин с подозрением на РШМ, включающий определение IL-2 в сыворотке крови и MMP-9 в лизате Нф.

**Ключевые слова:** цервикальная интраэпителиальная неоплазия, рак шейки матки, нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, цитокины, металлопротеиназы

### Адрес для переписки:

Генинг Татьяна Петровна  
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»  
432017, Россия, г. Ульяновск,  
ул. Архитектора Ливчака, 2.  
Тел.: 8 (8422) 32-70-71.  
E-mail: naum-53@yandex.ru

### Address for correspondence:

Gening Tatyana P.  
Ulyanovsk State University  
432017, Russian Federation, Ulyanovsk, Arch. Livchak str., 2.  
Phone: 7 (8422) 32-70-71.  
E-mail: naum-53@yandex.ru

### Образец цитирования:

Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, Д.Р. Долгова, И.И. Антонеева, А.Б. Песков, С.О. Генинг «Фенотип циркулирующих нейтрофилов на разных стадиях неоплазии шейки матки» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1127-1138.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138

© Абакумова Т.В. и соавт., 2019

### For citation:

T.V. Abakumova, T.P. Gening, D.R. Dolgova, I.I. Antoneeva, A.B. Peskov, S.O. Gening "Phenotype of circulating neutrophils at different stages of cervical neoplasia", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1127-1138.

doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138

## PHENOTYPE OF CIRCULATING NEUTROPHILS AT DIFFERENT STAGES OF CERVICAL NEOPLASIA

Abakumova T.V.<sup>a</sup>, Gening T.P.<sup>a</sup>, Dolgova D.R.<sup>a</sup>, Antoneeva I.I.<sup>a, b</sup>,  
Peskov A.B.<sup>a</sup>, Gening S.O.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Regional Center of Clinical Oncology, Ulyanovsk, Russian Federation

**Abstract.** At the present time, there is no common point of view to the role of circulating neutrophils (NP) in emergence and development of neoplasia. It is suggested that due to high functional plasticity, the neutrophils may exhibit both pro- and antitumor activity. In order to study the NP phenotype at different stages of cervical neoplasia (CN), we have evaluated their absolute and relative amounts, myeloperoxidase activity, spontaneous and induced NST-test markers, and the level of intracellular cationic proteins. Spontaneous production of elastase and active forms of matrix metalloproteinases, the levels of IL-2, IL-8, IL-18, IFN $\gamma$ , G-CSF were determined in the NP cell lysates and in blood serum. The formation of extracellular traps (NET) was evaluated using 1-day cultures of *Saccharomyces cerevisiae* as an inducer. We examined 31 patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 21 primary patients with cervical cancer (CC, Ia stage according to FIGO scale), as well as 25 practically healthy women. We revealed increased spontaneous and inducible oxygen-dependent cytolytic and phagocytic activity and spontaneous production of NET if compared to normal values, along with decreased absolute NP numbers in patients with CIN, thus suggesting the antitumor activity of NP. The levels of “pro-tumor” cytokines (MMP-9, IL-2 and G-CSF) become increased over normal levels as early as at the CIN stage, both for the neutrophils and blood plasma. High levels of regulatory IFN $\gamma$  and neutrophil-priming IL-8 in blood plasma do not presume any use of exogenous NP-activating factors at the stage of cervical dysplasia. At the initial stage of cervical cancer, the absolute NP amounts are significantly increased compared to normal counts. However, despite increased spontaneous oxygen-dependent cytolytic activity, the NPs have a significantly reduced activity of phagocytosis and sharply increased spontaneous production of NET, thus, generally, being characteristic to the “pro-tumorous” NP phenotype. IL-2 levels are elevated, and MMP-9 values are still increased in NP and blood plasma of patients with CC (stage Ia). Hence, the obtained results suggest some changes of NP phenotype to a pro-tumorous pattern during transition from intraepithelial dysplasia to cervical cancer. These results allowed us to design an algorithm for examining women with suspected cervical cancer, including IL-2 measurement in blood serum, and MMP-9 amounts in the NP lysates.

**Keywords:** cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer, neutrophils, neutrophilic extracellular traps, cytokines, metalloproteinases

### Введение

Солідные клинические исследования показали, что количество нейтрофилов (Нф) и их функциональное состояние в периферической крови изменяются у пациентов со злокачественными опухолями и при ряде локализаций эти изменения могут иметь прогностическое значение [23, 48, 56]. Нф сегодня рассматриваются как одна из основных популяций клеток-эффекторов, осуществляющих противоопухолевую защиту [21, 59]. Постулируется существование нескольких основных пулов Нф: циркулирующий и пристеночный, тканевой, сливарный и костномозговой [7]. Нф циркулируют в крови порядка 6-10 часов и далее перемещаются в ткани. Показано, что Нф в периферической крови и тканях способны к изменению метаболизма, экспрессии ряда генов, цитокинов, адгезионных молекул и рецепторов.

При этом, обладая высокой функциональной пластичностью, они могут проявлять как про-, так и противоопухолевую активность. С одной стороны, это подтвержденное *in vitro*, прямое цитотоксическое и цитостатическое действие Нф на клетки опухоли [30]. Они разрушают трансформированные и опухолевые клетки, используя антимикробное и цитотоксическое содержимое гранул. Однако механизмы цитотоксичности Нф еще недостаточно изучены. Возможно, это связано с коротким периодом полувыведения и нестабильностью этих механизмов. Исследования *in vivo* позволили предположить формирование зон плотного контакта (цитотоксических синапсов) между мишенью и миелоидными клетками для последующей элиминации опухоли [42, 59]. Нф накапливаются в зонах интенсивного роста опухоли и блокируют диффузию опухолевых кле-

ток [15]. Цитокины, хемокины и факторы роста, секретируемые нейтрофилами, могут привлекать и активировать клетки врожденного и адаптивного иммунитета, то есть вызывать косвенный противоопухолевый эффект [14, 35]. Нф участвуют в патогенезе внеклеточно, выделяя мощные противомикробные вещества и протеазы либо образуя внеклеточные ловушки (NETs) [34]. NET выделяются активированными Нф в ответ на аутоиммунные стимулы, инфекционные агенты, асептическое воспаление и рак. При этом мембрана ядра распадается, хроматин деконденсируется и белки из нейтрофильных гранул (лактоферин, миелопероксидаза (МПО)) и гистоны ядра связываются с деконденсированной ДНК, и вся структура выбрасывается из клетки. Показано, что NETs захватывают, но не убивают микробы [38]. При этом продлевается выживаемость Нф, выбрасывающих ловушки [60]. В то же время многочисленные исследования показывают, что неконтролируемое, чрезмерное высвобождение или неадекватное удаление NET способствует развитию ряда патологических состояний [41]. На сегодня нет единой точки зрения относительно роли NET в канцерогенезе. Работами Долгушина И.И. и соавт. [4] показано, что механизм образования NET обладает специфичностью, что может быть связано с преактивацией «праймирования» нейтрофилов собственными опухолевыми клетками. Полагают, что NET могут реализовать противоопухолевые эффекты, уничтожая опухолевые клетки либо активируя иммунную систему [13]. NETs могут убить активированную эндотелиальную клетку, повреждать кровеносные сосуды опухоли [28, 45]. В то же время показано, что NET захватывают циркулирующие опухолевые клетки, что приводит к увеличению их адгезии, образованию микро- и макрометастазов [20]. Показано, что нейтрофильная эластаза и ММП-9, ассоциированные с NET, последовательно расщепляют ламинины, которые затем индуцируют пролиферацию спящих раковых клеток [10, 39]. Кроме того, NET, содержащие мощные протеазы, могут способствовать метастазированию, расщепляя внеклеточный матрикс. Сети могут также образовывать барьер между раковыми клетками и иммунной системой, что позволяет раковым клеткам избегать иммунного распознавания [13]. Понятие «иммунодефицит рака (immunoediting)» [32] предполагает, что иммунная система может как идентифицировать и уничтожать опухолевые клетки, так и способствовать прогрессированию опухоли. В многочисленных исследованиях было установлено, что про- либо противоопухолевая активность Нф зависит от типа локализации и стадии процесса и профиля цитокинов микроокружения опухо-

ли [5, 52]. Показано, что Нф могут способствовать росту опухоли путем секреции ММП-9, которая предотвращает апоптоз опухолевых клеток [9], а также опухолевому ангиогенезу и неоваскуляризации [36]. При этом Нф, продуцируя перекись водорода, подавляют реакции адаптивного иммунитета [49]. Имеются также данные об изменении функций Нф при развитии опухоли [8, 53]. Однако более 90% результатов, представленных в публикациях, посвященных роли Нф в динамике канцерогенеза, получены в эксперименте и для опухоль-ассоциированных клеток.

**Целью исследования** было изучение фенотипа циркулирующих Нф на разных стадиях неоплазии шейки матки.

## Материалы и методы

Обследуемая группа состояла из 31 пациентки с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (CIN) и 21 первичных больных РШМ Ia стадии (по FIGO), находящихся на лечении в Ульяновском областном клиническом онкологическом диспансере. Контрольную группу составили практически здоровые женщины (n = 25) в возрасте 22-45 лет. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси на двойном градиенте плотности стерильных растворов фиколла-урографина ( $\rho = 1,117$  и  $1,077$  г/мл). Чистота фракции нейтрофилов составляла 92-94%. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0,5% трипановым синим составляла 95%. Выделенные и отмытые нейтрофилы помещали по  $50 \pm 5$  тысяч клеток в 1,5 мл физиологического раствора и путем замораживания-оттаивания из них получали лизаты. Спонтанную продукцию эластазы (eBioscience, Австрия) и активных форм матриксных металлопротеиназ (ММП-9 (Quantikine, R&D Systems, США), ММП-1 (BCM Diagnostics, США), ММП-13 (BenderMedsystems, США)), IL-2, IL-8, IL-18, IFN $\gamma$ , G-CSF (ЗАО «Вектор-Бест-Волга», Россия) определяли твердофазным иммуноферментным методом в сыворотке крови и лизате Нф. Лизаты Нф хранились в течение месяца при  $-25$  °С. Для определения NET, нейтрофилы, выделенные из периферической крови, окрашивали с помощью 0,04% раствором акридинового оранжевого по методу Долгушина И.И. и соавт. (2010). Образование внеклеточных ловушек оценивали после инкубации Нф с выбранной нами в качестве индуктора суточной культурой *Saccharomyces cerevisiae*. Полученные результаты оценивали на флуоресцентном микроскопе, используя при этом фильтры, которые обеспечивают возбуждающий свет с длиной волны не более 490 нм и эмиссию с длиной волны 520 нм. В суспензии подсчитывали число нейтрофилов с сегментированным ядром, клеток с недифференци-

рованным ядром и NET, которые пересчитывали на 100 клеток. Полученные результаты выражали в процентах. Высчитывали число нейтрофильных ловушек (%) – количество нейтрофильных ловушек, содержащих дрожжевые клетки, из 100 подсчитанных сетеподобных структур; и индекс нейтрофильной ловушки (у. е.) – число дрожжевых клеток в 100 подсчитанных ловушках в пересчете на 1 структуру.

Оценивали общее количество лейкоцитов, абсолютное и относительное количество Нф, способность Нф генерировать АФК в реакции восстановления нитросинего тетразолия (спонтанный и индуцированный НСТ-тест) [2]. Микробицидную активность оценивали и по уровню активности миелопероксидазы методом Грэхема–Кнолля и катионных белков по М.Г. Шубичу [6]. Результаты выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Иммунофенотипирование нейтрофилов проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon Ni-U с использованием моноклональных антител (МКА) к поверхностным антигенам CD11b, CD16, CD63, CD95 (ЗАО «Сорбент», Москва).

Статистический анализ данных производился с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10 (One-way ANOVA).

В качестве центральной характеристики применяли медиану, а при сравнении использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали данные при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Нами установлено снижение общего количества лейкоцитов и абсолютного количества Нф у больных с дисплазией и увеличение этих показателей и относительного количества Нф у пациентов с РШМ (табл. 1).

При этом отношение Нф к лимфоцитам (NLR) у пациентов с дисплазией составило  $\geq 2,1$ ; с РШМ  $\geq 3,4$  против  $\geq 1,4$  в контроле. Сходную динамику количества Нф и отношение NLR при дисплазии и РШМ отмечали ряд исследователей [54]. Авторы указывают, что в группе с нейтрофилией при РШМ было повышено число рецидивов и метастазов по сравнению с пациентами с нейтрофилией при дисплазии шейки матки. Cho H. и соавт. показали, что у пациентов с первичным РЯ NLR значительно выше, чем у пациентов с доброкачественными гинекологическими заболеваниями или в контроле [19]. При этом было показано, что повышенное количество Нф связано с короткой, общей и безрецидивной выживаемостью [50]. Таким образом, данные литературы свидетельствуют о связи высокого уровня Нф циркулирующей крови с плохим клиническим исходом у больных

раком. Эффекторные функции иммунных клеток тесно связаны с их метаболическим состоянием. Анализ полученных данных свидетельствует, что активность МПО в спонтанном тесте при дисплазии шейки матки оказывается значимо повышенной по сравнению с контролем и имеет тенденцию к дальнейшему повышению у больных РШМ Ia (табл. 2).

Интенсивность продукции Нф активных форм кислорода (АФК) осуществляется в основном при участии NADPH-оксидазы и дыхательной цепи митохондрий МПО [31]. Нами установлено значимое увеличение количества Нф, активных как в спонтанном, так и в активированном НСТ-тесте у больных с дисплазией шейки матки (табл. 2), и резкое снижение числа этих Нф по сравнению с контролем у пациентов с РШМ Ia (табл. 2).

АФК, продуцируемые активированными Нф, с одной стороны, участвуют в лизисе опухолевых клеток [61], с другой – действие АФК может быть генотоксичным и, следовательно, проопухолевым. Существует мнение, что исходная мутация (смерть будет зависеть от дозы АФК) [43].

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать повышенную по сравнению со здоровыми спонтанную и индуцированную кислородзависимую (МПО, НСТ-тест) цитолитическую активность циркулирующих Нф у пациенток с дисплазией шейки матки. Нф при этом, возможно, могут повреждать клетки организма. У пациенток с РШМ Ia как кислородзависимая, так и кислород-независимая активность (КБ) была резко и значимо снижена в циркулирующих Нф как по сравнению со здоровыми, так и по сравнению с пациентами с дисплазией шейки матки. Нф при этом, вероятно, не способны полноценно защищать организм от патогенов.

Fridlender Z.G. и соавт. (2009) постулировали наличие N1 (противоопухолевых) и N2 (протуморальных) опухолеподобных Нф [25]. Эта пластичность Нф регулируется молекулами в микроокружении опухоли. Трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ) – иммуносупрессивный цитокин, индуцирует фенотип N2 и предотвращает образование проопухолевых N1. При TGF- $\beta$  блокаде N1 усиленно экспрессируют иммуноактивирующие цитокины и хемокины, более низкие уровни аргиназы, более высокую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток, ингибируют ангиогенную активность опухоли, существует концепция поляризации Нф средней цитокинов. Возможно, что изменения в фенотипах N1 и N2 основаны на различной степени активации Нф. Однако неясно, являются ли N1 просто более активными, чем N2 [43].

**ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТОЗА И ОБРАЗОВАНИЯ NET НЕЙТРОФИЛАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ДИСПЛАЗИЕЙ И РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ**

TABLE 1. INDICATORS OF PHAGOCYTOSIS AND THE FORMATION OF NET BY NEUTROPHILS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH DYSPLASIA AND CERVICAL CANCER

Группа Group	Показатель Indicator	Контроль Control n = 25	Дисплазия Dysplasia n = 21	Рак шейки матки Cervical cancer n = 15
	Активность фагоцитоза, % Phagocytosis activity, %	3,50±1,82	4,71±0,63	2,25±0,77#
	Интенсивность фагоцитоза, у. е. Phagocytosis intensity, c. u.	1,52±0,07	1,05±0,02	0,38±0,18* #
	Индекс NET, у. е. NET index, c. u.	1,50±0,29	2,71±0,46	0,88±0,11* #
	Число NET, % NET count, %	1,33±0,33	4,76±1,06*	8,75±3,03* #

Примечание. \* – показатель значительно отличается от такового в контроле; # – показатель значительно отличается от такового при дисплазии.

Note. \*, the level is significantly different from that in the control; #, the level is significantly different from that in dysplasia.

**ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО ЛЕЙКОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ С ДИСПЛАЗИЕЙ И РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ**

TABLE 2. NUMBER OF LEUKOCYTES AND NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CERVICAL DYSPLASIA AND CERVICAL CANCER

Группа Group	Показатель Indicator	Контроль Control (n = 25)	Дисплазия Dysplasia (n = 31)	Рак шейки матки Ia CCla (n = 21)
	Количество Ле × 10 <sup>9</sup> /л Number of Le × 10 <sup>9</sup> /l	6,401±0,280	5,87±0,11 (p <sub>1</sub> = 0,8490)	6,72±0,53 (p <sub>1</sub> = 0,3527; p <sub>2</sub> = 0,4491)
	Количество Нф, % Percentage of Nph, %	55,910±2,060	57,79±2,59 (p <sub>1</sub> = 0,3793)	65,0±2,9 (p <sub>1</sub> = 0,1468; p <sub>2</sub> = 0,2836)
	Количество Нф × 10 <sup>9</sup> /л Number of Nph × 10 <sup>9</sup> /l	3,600±0,030	2,48±0,27 (p <sub>1</sub> = 0,0001)	4,29±0,21 (p <sub>1</sub> = 0,0063; p <sub>2</sub> = 0,1665)

Примечание. p<sub>1</sub> – по сравнению с контролем; p<sub>2</sub> – по сравнению с дисплазией шейки матки.

Note. p<sub>1</sub>, compared with the control; p<sub>2</sub>, compared with group of cervical dysplasia.

В циркулирующей крови организма-опухоленосителя выявляется несколько клеточных популяций клеток с нейтрофилоподобной морфологией и проявляющих иммуносупрессивные или провоспалительные свойства [17, 24, 44]. При центрифугировании в градиенте плотности можно получить две основные популяции: Нф низкой плотности и Нф нормальной плотности. Сообщается, что Нф нормальной плотности имеют классические воспалительные характеристики (фракция N1). Нф с низкой плотностью (N2)

имеют противовоспалительный фенотип и усиливают прогрессирование опухоли [47, 58].

Нф формируют «цитокиновую сеть», секретируя огромный спектр про- и противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов, колониестимулирующих факторов, регуляторных белков [35,51]. В результате проведенных исследований нами установлены значимые изменения по сравнению с контролем уровня IL-2, IFN $\gamma$ , G-CSF, эластазы и MMP-9 в сыворотке крови и лизате Нф больных с дисплазией шейки матки

и РШМ Ia (табл. 3, 4). Нами было установлено значимое увеличение уровня IL-2, относящегося к регуляторным цитокинам, в сыворотке крови и лизате Нф у пациентов с дисплазией шейки матки и резко выраженное его увеличение при РШМ Ia (табл. 3, 4). Существует мнение, что повышение системного уровня IL-2 стимулирует опухолевый рост, а иммунные клетки у больных с дисплазией шейки матки экспрессируют рецепторы к IL-2, что может свидетельствовать об их активации [1, 33].

Наиболее изученным и общепризнанным механизмом Нф-индуцированной прогрессией опухоли является усиление ангиогенеза. Это реализуется при участии такого ангиогенного фактора, как MMP-9 [11]. MMP-9 и эластаза участвуют в инвазии и миграции опухолевых клеток, что способствует метастазированию опухолей [55]. Также показано, что MMP-9 предотвращает апоптоз опухолевых клеток, в частности при раке легких [9].

IL-8 считается сильным хемоаттрактантом, активирующим миграцию Нф в опухоль. При этом сами опухолевые клетки могут секретировать IL-8 [27]. Длительность жизни Нф увеличивается в зоне воспаления, что индуцируется IL-8 и GM-CSF [16]. Повышенный уровень этого цитокина в крови больных с плоскоклеточным раком головы и шеи был ассоциирован с прогрессированием опухолевого процесса [57]. Нами установлено значимое снижение уровня IL-8 в лизате периферических Нф больных РШМ Ia и повышение уровня этого цитокина в сыворотке крови при дисплазии шейки матки (табл. 3, 4).

Считается доказанным, что Нф могут быть основным источником цитокинов [18]. В то же время показано, что ряд цитокинов, включая IFN $\gamma$  и G-CSF, индуцирующих местный гранулоцитоз *in vivo*, могут секретироваться опухолевыми клетками [22]. При этом регуляторные цитокины, в том числе IFN $\gamma$ , подавляют входение Нф в апоптоз и удлиняют время их жизни [29]. Нами установлено резкое и значимое возрастание уровней IFN $\gamma$  и G-CSF в лизате Нф у больных с дисплазией шейки матки по сравнению с контролем (табл. 3). У пациентов с РШМ уровень данных цитокинов возвращается к норме (табл. 3). В сыворотке крови уровень IFN $\gamma$ , резко повышенный у больных с дисплазией, несколько снижается у больных с РШМ, не достигая, однако, нормы (табл. 4). Уровень G-CSF оказывается сниженным по сравнению с нормой у больных с дисплазией и РШМ (табл. 4).

Таким образом, анализ спектра цитокинов в лизате Нф и сыворотке крови позволяет предполагать значимые изменения уровней изученных цитокинов у пациентов в лизате перифери-

ческих нейтрофилов уже на стадии дисплазии шейки матки. При этом на фоне резкого увеличения как в лизате, так и в плазме крови уровня регуляторного IFN $\gamma$  значимо возрастают уровни «проопухолевых» MMP-9, IL-2 и G-CSF. Уровень IL-8, праймирующего активацию Нф на стадии дисплазии, повышается только в сыворотке крови. В лизате Нф и плазме крови больных с РШМ повышенным остается уровень IL-2 и значимо возрастает уровень MMP-9.

Показано, что Нф при встрече с опухолевыми клетками активируются и формируют вокруг них NET [3]. В ранних исследованиях была установлена зависимость формирования NET от активных форм кислорода (ROS), генерируемых NADPH-оксидазным путем [26]. Однако в ряде исследований *in vitro* и *in vivo* была установлена независимость образования NET от ROS [12, 37]. Это несоответствие на данном этапе не имеет объяснения. В результате проведенных нами исследований установлено значимое возрастание числа NET, образованных Нф больных раком шейки матки, как по сравнению с контролем, так и по сравнению с Нф пациенток с дисплазией (табл. 5).

Активность миелопероксидазы нейтрофилов периферической крови женщин с раком шейки матки Ia умеренно ( $r = 0,3217$ ) коррелирует с уровнем НВЛ, в отличие от нейтрофилов периферической крови женщин с дисплазией, где обнаружена слабая положительная корреляционная связь по Спирмену ( $r = 0,2189$ ).

Существует точка зрения, что снижение фагоцитоза и усиление ROS-продукции характерны для проопухолевого фенотипа Нф. Подобные Нф, их также называют клетками низкой плотности, были описаны при раке и имеют повышенную спонтанную продукцию NET [46].

Анализируя полученные данные, мы предположили, что исследованные показатели плазмы и Нф циркулирующей крови могут быть использованы в качестве маркеров прогрессии цервикальных неоплазий. Нами был использован дисперсионный анализ ANOVA. Было отобрано 10 показателей, дающих четкие межгрупповые различия нормы (1) и дисплазией (2) с РШМ (3) (ИНЛ, у. е.; ВНЛ, %; CD95 + Нф, уровень IL-2, MMP-9, эластазы, IL-8 лизате Нф, а также уровень MMP-13, IL-2, эластазы в сыворотке крови).

Было установлено, что идеальный показатель — уровень IL-2 в сыворотке крови. Его достаточно для того, чтобы различить принадлежность к любой из групп.

Можно предположить, что указанные в графиках изменения непрерывны и не имеют дополнительных колебаний.

**ТАБЛИЦА 3. АКТИВНОСТЬ МПО, ПОКАЗАТЕЛИ СПОНТАННОГО И ИНДУЦИРОВАННОГО НСТ-ТЕСТА И УРОВЕНЬ КБ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НФ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ НЕОПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ**

TABLE 3. MPO ACTIVITY, INDICES OF SPONTANEOUS AND INDUCED NBT TEST AND THE CP LEVEL IN CIRCULATING NP AT DIFFERENT STAGES OF CERVICAL NEOPLASIA

Показатель Indicator  Группа Group	МПО, СЦК MPO, mean cytochemical coefficient	КБ, СЦК CP, mean cytochemical coefficient	НСТ-тест NBT test			
			Спонтанный Spontaneous		Индукцированный Induced	
			% активных клеток % active cells	у. е. с. у.	% активных клеток % active cells	у. е. с. у.
<b>Контроль</b> Control n = 25	1,18±0,13	2,34±0,09	99,33±0,38	1,56±0,18	99,83±0,17	2,23±0,19
<b>Дисплазия</b> Dysplasia n = 31	1,86±0,21 (p <sub>1</sub> = 0,0199)	2,46±0,04 (p <sub>1</sub> = 0,7044)	97,53±0,58 (p <sub>1</sub> = 0,0267)	2,78±0,14 (p <sub>1</sub> = 0,7960)	98,89±0,19 (p <sub>1</sub> = 0,4815)	3,63±0,14 (p <sub>1</sub> = 0,7960)
<b>РШМ Ia</b> CC Ia n = 21	1,95±0,16 (p <sub>1</sub> = 0,0018; p <sub>2</sub> = 0,8792)	1,85±0,08 (p <sub>1</sub> = 0,0019; p <sub>2</sub> = 0,0052)	95,67±1,13 (p <sub>1</sub> = 0,0211; p <sub>2</sub> = 0,4722)	0,50±0,30 (p <sub>1</sub> = 0,1795; p <sub>2</sub> = 0,0550)	97,67±0,23 (p <sub>1</sub> = 0,2225; p <sub>2</sub> = 0,4035)	1,18±0,06 (p <sub>1</sub> = 0,7142; p <sub>2</sub> = 0,3403)

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

**ТАБЛИЦА 4. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ, ЭЛАСТАЗЫ И МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ЛИЗАТЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕЙТРОФИЛОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ НЕОПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ**

TABLE 4. LEVEL OF CYTOKINES, ELASTASE AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE LYSATE OF PERIPHERAL NEUTROPHILS AT DIFFERENT STAGES OF CERVICAL NEOPLASIA

	<b>Контроль</b> Control n = 25	<b>Дисплазия шейки матки</b> Cervical dysplasia n = 31	<b>РШМ Ia</b> CC Ia n = 21
<b>IL-2, пг/мл</b> pg/ml	3,953±0,515 (3,246-4,956)	8,052±0,401* (5,035-14,692)	59,835±3,177** (10,620-97,459)
<b>IL-8, пг/мл</b> pg/ml	165,162±15,888 (57,064-237,041)	175,187±8,305 (30,147-258,482)	60,538±6,519** (11,249-112,185)
<b>IL-18, пг/мл</b> pg/ml	45,898±16,550 (5,378-160,664)	51,645±9,559 (5,657-308,490)	14,198±2,208** (5,343-35,832)
<b>IFN<math>\gamma</math>, пг/мл</b> pg/ml	2,510±0,468 (0,000-4,879)	11,400±0,691* (4,463-16,987)	3,255±0,211# (1,06-6,47)
<b>G-CSF, пг/мл</b> pg/ml	0,129±0,037 (0,000-0,282)	11,568±1,136* (3,043-23,563)	0
<b>Эластаза, нг/мл</b> Elastase, ng/ml	0,353±0,049 (0,117-0,687)	0,691±0,064* (0,101-1,520)	2,168±0,113** (1,038-3,205)
<b>ММП-1, нг/мл</b> MMP-1, ng/ml	0,507±0,051 (0,126-0,743)	0,603±0,031 (0,194-0,868)	0,753±0,059 (0,344-1,180)
<b>ММП-9, нг/мл</b> MMP-9, ng/ml	29,814±0,504 (26,663-30,742)	41,064±0,143* (38,000-41,873)	1,143±0,063** (0,83-1,58)
<b>ММП-13, нг/мл</b> MMP-13, ng/ml	11,818±1,693 (0,000-22)	10,615±0,095 (9,163-11,000)	8,905±0,006 (0,000-18,5)

Примечание. \* – отличие статистически значимо по сравнению с контролем (p ≤ 0,05); # – отличие статистически значимо по сравнению с показателем при дисплазии (p ≤ 0,05).

Note. \*, the difference is statistically significant compared with the control (p ≤ 0.05); #, the difference is statistically significant compared with the level in dysplasia (p ≤ 0.05).

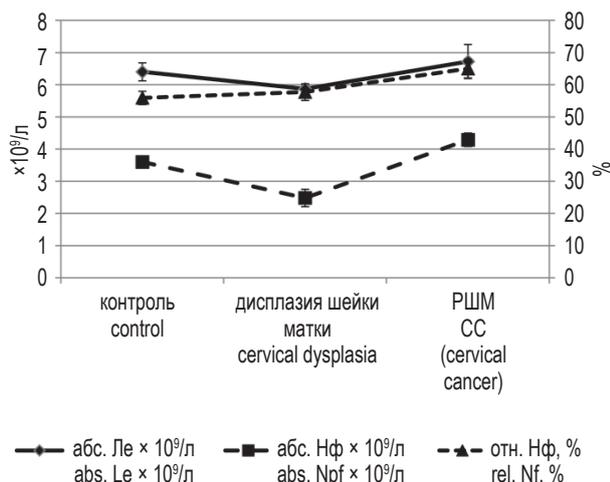
**ТАЛИЦА 5. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ, ЭЛАСТАЗЫ И МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ НА РАЗНОЙ СТАДИИ НЕОПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ**

TABLE 5. LEVEL OF CYTOKINES, ELASTASE AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS AT DIFFERENT STAGES OF CERVICAL NEOPLASIA

	Контроль Control n = 25	Дисплазия шейки матки Cervical dysplasia n = 31	РШМ Ia CC Ia n = 21
IL-2, пг/мл pg/ml	2,428±0,229 (1,289-3,634)	3,758±0,044 (3,398-4,095)	22,667±0,932*# (11,182-30,736)
IL-8, пг/мл pg/ml	12,487±1,269 (7,848-23,188)	24,144±1,462* (5,765-38,493)	14,513±0,590# (10,426-18,921)
IL-18, пг/мл pg/ml	310,294±83,903 (0,000-874,858)	434,789±17,607 (273,583-669,655)	450,783±11,956 (359,497-543,092)
IFN $\gamma$ , пг/мл pg/ml	4,183±0,702 (1,086-9,111)	13,475±1,226* (4,012-29,016)	12,714±2,359* (1,27-43,17)
G-CSF, пг/мл pg/ml	49,029±6,388 (1,413-93,299)	37,125±1,537* (9,687-56,685)	29,963±1,851*# (12,189-55,953)
Эластаза, нг/мл Elastase, ng/ml	2,227±0,125 (1,663-3,117)	1,059±0,004* (1,012-1,117)	1,770±0,025 (1,562-1,981)
ММП-1, нг/мл MMP-1, ng/ml	0,086±0,008 (0,038-0,114)	0,247±0,007* (0,185-0,354)	0,348±0,029* (0,117-0,663)
ММП-9, нг/мл MMP-9, ng/ml	4,159±0,531 (0,915-8,093)	5,654±0,296 (1,687-9,180)	9,419±0,718* (2,706-14,404)
ММП-13, нг/мл MMP-13, ng/ml	20,454±2,305 (11,0-33,0)	18,662±0,075 (18,037-19,000)	6,766±1,267*# (0,0-22,5)

Примечание. \* – отличие статистически значимо по сравнению с контролем; # – отличие статистически значимо по сравнению с показателем при дисплазии.

Note. \*, the difference is statistically significant compared with the control; #, the difference is statistically significant compared with level in dysplasia.



**Рисунок 1. Алгоритм оценки степени цервикальной неоплазии**

Figure 1. Algorithm for assessing the grade of cervical neoplasia

В этом случае для оценки степени цервикальной неоплазии может быть использован следующий алгоритм (рис. 1): если уровень IL-2 ниже 3,0, констатируем отсутствие неоплазии; если уровень IL-2 выше 3,0, рекомендуется дополнительная оценка в лизате Нф периферической крови уровни ММП-9. Дисплазия вероятна при уровне ММП-9 выше 40; РШМ – при уровне ММП-9 ниже 5.

## Заключение

На фоне значимого снижения абсолютного количества Нф циркулирующей крови пациентов с дисплазией шейки матки, по сравнению с нормой, характеризуются повышенной кислородзависимой цитолитической и фагоцитарной активностью и повышенной спонтанной продукцией NET, что может свидетельствовать об их противоопухолевой активности. В то же время уже на стадии дисплазии как в Нф, так и в плазме крови возрастают по сравнению с нормой уровни «проопухолевых» цитокинов ММП-9, IL-2 и G-CSF. Высокие уровни в плазме крови регуляторного IFN $\gamma$  и праймирующего активацию

нейтрофилов IL-8 не предполагают использование на стадии дисплазии шейки матки экзогенных стимуляторов активности Нф. У пациенток на начальной стадии РШМ значительно по сравнению с нормой увеличено абсолютное количество Нф циркулирующей крови. Однако на фоне повышенной спонтанной кислородзависимой цитолитической активности у них значительно снижена активность фагоцитоза и резко повышена

спонтанная продукция NET, что в целом характерно для «проопухолевого» фенотипа Нф. В Нф и плазме крови больных РШМ Ia сохраняется повышенный уровень IL-2 и продолжает возрастать уровень ММП-9. Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать изменение фенотипа циркулирующих Нф при переходе от дисплазии к РШМ в сторону увеличения проопухолевых клеток низкой плотности.

## Список литературы / References

1. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли I. Клетки и цитокины – участники воспаления // Онкология, 2009. № 1. С. 6-17. [Berezhnaya N.M. Role of immune system cells in tumor microenvironment. I. Cells and cytokines – the components of inflammation. *Oncologiya = Oncology*, 2009, no. 1, pp. 6-17. (In Russ.)]
2. Герасимов И.Г., Калуцкая О.А. Кинетика реакции восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами крови человека // Цитология, 2000. Т. 42, № 2. С. 160-165. [Gerasimov I.G., Kalutskaya O.A. Kinetics of the reaction of nitroblue tetrazolium reduction by human blood neutrophils. *Tsitologiya = Cytology*, 2000, Vol. 42, no. 2, pp. 160-165. (In Russ.)]
3. Долгушин И.И., Семенова А.Б., Шишкова Ю.С., Казачков Е.Л., Шаманова А.Ю., Важенин А.В. Функциональная активность нейтрофилов и процессы формирования ими сетей внеклеточной ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы молочной железы // Медицинский вестник Башкортостана, 2014. Т. 9, № 5. С. 132-135. [Dolgushin I.I., Semenova A.B., Shishkova Yu.S., Kazachkov E.L., Shamanova A.Yu., Vazhenin A.V. Functional activity of neutrophils and processes of formation of extracellular DNA networks after their contact with tumor cells of breast carcinoma. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal*, 2014, Vol. 9, no. 5, pp. 132-135. (In Russ.)]
4. Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Семенова А.Б., Казачков Е.Л., Важенин А.В., Шаманова А.Ю., Димов Г.П. Взгляд на роль нейтрофильного внеклеточного ДНК, как компонента микроокружения опухоли, в процессах канцерогенеза // Уральский медицинский журнал, 2014. № 2 (116). С. 19-22. [Dolgushin I.I., Shishkova Yu.S., Semenova A.B., Kazachkov E.L., Vagenin A.V., Shamanova A.Yu., Dimov G.P. View on the role of neutrophils extracellular DNA as a component of the microenvironment of tumor in the process of carcinogenesis. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2014, no. 2 (116), pp. 19-22. (In Russ.)]
5. Мальцева В.Н., Авхачева Н.В., Санталов Б.Ф., Сафронова В.Г. Наблюдение в динамике модификации функциональной активности периферических нейтрофилов и ее регуляции при росте опухоли *in vivo* // Цитология, 2006. Т. 48, № 12. С. 1000-1009. [Maltseva V.N., Avkhacheva N.V., Santalov B.F., Safronova V.G. Dynamic analysis of modification of peripheral neutrophils functional activity and its regulation during tumor growth *in vivo*. *Tsitologiya = Cytology*, 2006, Vol. 48, no. 12, pp. 1000-1009. (In Russ.)]
6. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы: руководство для врачей / под ред. А.И. Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. 696 с. [Medical laboratory diagnostics: programs and algorithms: a guide for doctors. Ed. A.I. Karpischenko. 3<sup>rd</sup> ed., rev. and enlarged]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 696 p.
7. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Коков Е.А., Ломтатидзе Л.В., Сторожук С.В., Уваров И.Б., Казанцева М.В. Особенности фенотипа нейтрофильных гранулоцитов при неопластических процессах // Российский иммунологический журнал, 2010. Т. 4 (13), № 4. С. 374-380. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Kokov E.A., Lomtadidze L.V., Storozhuk S.V., Uvarov I.B., Kazantseva M.V. The neutrophil phenotype in neoplastic process. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2010, Vol. 4 (13), no. 4, pp. 374-380. (In Russ.)]
8. Чердынцева Н.В., Наумов С.А., Удут В.В., Пешкова О.А., Шепеткин И.А. Окислительный метаболизм нейтрофильных гранулоцитов крови при предраке и раке желудка // Биохимия, 1992. № 7. С. 182-187. [Cherdyntseva N.V., Naumov S.A., Udut V.V., Peshkova O.A., Shepetkin I.A. Oxidative metabolism of neutrophilic blood granulocytes in precancer and gastric cancer. *Biokhimiya = Biochemistry*, 1992, no. 7, pp. 182-187. (In Russ.)]
9. Acuff H.B., Carter K.J., Fingleton B., Gorden D.L., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res.*, 2006, Vol. 66, no. 1, pp. 259-266.
10. Albregues J., Shields M.A., Ng D., Park C.G., Ambrico A., Poindexter M.E., Upadhyay P., Uyeminami D.L., Pommier A., Küttner V., Bružas E., Maiorino L., Bautista C., Carmona E.M., Gimotty P.A., Fearon D.T., Chang K., Lyons S.K., Pinkerton K.E., Trotman L.C., Goldberg M.S., Yeh J.T., Egeblad M. Neutrophil extracellular traps

produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science*, 2018, Vol. 361, no. 6409. pii: eaao4227. doi: 10.1126/science.aao4227.

11. Ardi V.C., Kupriyanova T.A., Deryugina E.I., Quigley J.P. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 51, pp. 20262-20267.

12. Barth C.R., Funchal G.A., Luft C., de Oliveira J.R., Porto B.N., Donadio M.V. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, no. 4, pp. 964-970.

13. Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abed U.A., Kühn L.I., Ben-Ezra J., Elhasid R., Zychlinsky A. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 48.

14. Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.*, 2007, Vol. 28, no. 8, pp. 340-345.

15. Brú A., Albertos S., López García-Asenjo J.A., Brú I. Pinning of tumoral growth by enhancement of the immune response. *Phys. Rev. Lett.*, 2004, Vol. 92, no. 23, 238101. doi: 10.1103/PhysRevLett.92.238101.

16. Buckley C.D., Ross E.A., McGettrick H.M., Osborne C.E., Haworth O., Schmutz C., Stone P.C., Salmon M., Matharu N.M., Vohra R.K., Nash G.B., Rainger G.E. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 2, pp. 303-311.

17. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.*, 2013, Vol. 35, no. 4, pp. 455-463.

18. Cassatella M.A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.*, 1999, Vol. 73, pp. 369-509.

19. Cho H., Hur H.W., Kim S.W., Kim S.H., Kim J.H., Kim Y.T., Lee K. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2009, Vol. 58, no. 1, pp. 15-23.

20. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., Gowing S., Chow S., Giannias B., Bourdeau F., Kubes P., Ferri L. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.*, 2013, pii: 67484. doi: 10.1172/JCI67484.

21. di Carlo E., Forni G., Lollini P., Colombo M.P., Modesti A., Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 2, pp. 339-345.

22. di Carlo E., Forni G., Musiani P. Neutrophils in the antitumoral immune response. *Chem. Immunol. Allergy*, 2003, Vol. 83, pp. 182-203.

23. Donskov F., von der Maase H. Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2006, Vol. 24, no. 13, pp. 1997-2005.

24. Dumitru C.A., Moses K., Trellakis S., Lang S., Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 8, pp. 1155-1167.

25. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 2009, Vol. 16, no. 3, pp. 183-194.

26. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.*, 2007, Vol. 176, no. 2, pp. 231-241.

27. Gregory A.D., Houghton A.M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.*, 2011, Vol. 71, no. 7, pp. 2411-2416.

28. Gupta A.K., Joshi M.B., Philippova M., Erne P., Hasler P., Hahn S., Resink T.J. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.*, 2010, Vol. 584, no. 14, pp. 3193-3197.

29. Ichikawa H., Kokura S., Aw T.Y. Role of endothelial mitochondria in oxidant production and modulation of neutrophil adherence. *J. Vasc. Res.*, 2004, Vol. 41, no. 5, pp. 432-444.

30. Igney F.H., Behrens C.K., Krammer P.H. CD95L mediates tumor counterattack *in vitro* but induces neutrophil-independent tumor rejection *in vivo*. *Int. J. Cancer*, 2005, Vol. 113, no. 1, pp. 78-87.

31. Ishikawa F., Miyazaki S. New biodefense strategies by neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2005, Vol. 53, no. 3, pp. 226-233.

32. Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 2007, Vol. 121, no. 1, pp. 1-14.

33. Kobayashi A., Greenblatt R.M., Anastos K., Minkoff H., Massad L.S., Young M., Levine A.M., Darragh T.M., Weinberg V., Smith-McCune K.K. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, no. 18, pp. 6766-6774.

34. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 159-175.

35. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 8, pp. 519-531.

36. Masson V., de la Ballina L.R., Munaut C., Wielockx B., Jost M., Maillard C., Blacher S., Bajou K., Itoh T., Itohara S., Werb Z., Libert C., Foidart J.M., Noël A. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J.*, 2005, Vol. 19, no. 2, pp. 234-236.
37. Mejía S.P., Cano L.E., López J.A., Hernandez O., González Á. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*, 2015, Vol. 161, no. 5, pp. 1008-1017.
38. Menegazzi R., Declève E., Dri P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 5, pp. 1214-1216.
39. Najmeh S., Cools-Lartigue J., Rayes R.F., Gowing S., Vourtzoumis P., Bourdeau F., Giannias B., Berube J., Rousseau S., Ferri L.E., Spicer J.D. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via  $\beta$  1-integrin mediated interactions. *Int. J. Cancer*, 2017, Vol. 140, no. 10, pp. 2321-2330.
40. Nozawa H., Chiu C., Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 33, pp. 12493-12498.
41. Ortmann W., Kolarczkowska E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. *Cell Tissue Res.*, 2018, Vol. 371, no. 3, pp. 473-488.
42. Otten M.A., Bakema J.E., Tuk C.W., Glennie M.J., Tutt A.L., Beelen R.H., van de Winkel J.G., van Egmond M. Enhanced Fc $\alpha$ RI-mediated neutrophil migration towards tumour colonies in the presence of endothelial cells. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 7, pp. 1815-1821.
43. Piccard H., Muschel R.J., Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2012, Vol. 82, no. 3, pp. 296-309.
44. Pillay J., Tak T., Kamp V.M., Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013, Vol. 70, no. 20, pp. 3813-3827.
45. Saffarzadeh M., Juenemann C., Queisser M.A., Lochnit G., Barreto G., Galuska S.P., Lohmeyer J., Preissner K.T. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 2, e32366. doi: 10.1371/journal.pone.0032366.
46. Sagiv J.Y., Michaeli J., Assi S., Mishalian I., Kisos H., Levy L., Damti P., Lumbroso D., Polyansky L., Sionov R.V., Ariel A., Hovav A.H., Henke E., Fridlender Z.G., Granot Z. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.*, 2015, Vol. 10, no. 4, pp. 562-573.
47. Schernberg A., Blanchard P., Chargari C., Deutsch E. Neutrophils, a candidate biomarker and target for radiation therapy? *Acta Oncol.*, 2017, Vol. 56, no. 11, pp. 1522-1530.
48. Schmidt H., Suciú S., Punt C.J., Gore M., Kruit W., Patel P., Lienard D., von der Maase H., Eggermont A.M., Keilholz U.; American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma; EORTC 18951. Pretreatment levels of peripheral neutrophils and leukocytes as independent predictors of overall survival in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma: results of the EORTC 18951 Biochemotherapy Trial. *J. Clin. Oncol.*, 2007, Vol. 25, no. 12, pp. 1562-1569.
49. Schmielau J., Finn O.J. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 12, pp. 4756-4760.
50. Sharaiha R.Z., Halazun K.J., Mirza F., Port J.L., Lee P.C., Neugut A.I., Altorki N.K., Abrams J.A. Elevated preoperative neutrophil:lymphocyte ratio as a predictor of postoperative disease recurrence in esophageal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 2011, Vol. 18, no. 12, pp. 3362-3369.
51. Smuda C., Wechsler J.B., Bryce P.J. TLR-induced activation of neutrophils promotes histamine production via a PI3 kinase dependent mechanism. *Immunol. Lett.*, 2011, Vol. 141, no. 1, pp. 102-108.
52. Souto J.C., Vila L., Brú A. Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Med. Res. Rev.*, 2011, Vol. 31, no. 3, pp. 311-363.
53. Szuster-Ciesielska A., Hryciuk-Umer E., Stepulak A., Kupisz K., Kandefer-Szerszeń M. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol.*, 2004, Vol. 43, no. 3, pp. 252-258.
54. Tavares-Murta B.M., Mendonça M.A., Duarte N.L., da Silva J.A., Mutão T.S., Garcia C.B., Murta E.F. Systemic leukocyte alterations are associated with invasive uterine cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2010, Vol. 20, no. 7, pp. 1154-1159.
55. Tazawa H., Okada F., Kobayashi T., Tada M., Mori Y., Une Y., Sendo F., Kobayashi M., Hosokawa M. Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. *Am. J. Pathol.*, 2003, Vol. 163, no. 6, pp. 2221-2232.
56. Teramukai S., Kitano T., Kishida Y., Kawahara M., Kubota K., Komuta K., Minato K., Mio T., Fujita Y., Yonei T., Nakano K., Tsuboi M., Shibata K., Furuse K., Fukushima M. Pretreatment neutrophil count as an independent prognostic factor in advanced non-small-cell lung cancer: an analysis of Japan Multinational Trial Organisation LC00-03. *Eur. J. Cancer*, 2009, Vol. 45, no. 11, pp. 1950-1958.
57. Trellakis S., Farjah H., Bruderek K., Dumitru C.A., Hoffmann T.K., Lang S., Brandau S. Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2011, Vol. 24, no. 3, pp. 683-693.
58. Uribe-Querol E., Rosales C. Neutrophils in cancer: two sides of the same coin. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, 983698. doi: 10.1155/2015/983698.

59. van Spruiel A.B., Leusen J.H., van Egmond M., Dijkman H.B., Assmann K.J., Mayadas T.N., van de Winkel J.G. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 8, pp. 2478-2486.

60. Yipp B.G., Petri B., Salina D., Jenne C.N., Scott B.N., Zbytnuik L.D., Pittman K., Asaduzzaman M., Wu K., Meijndert H.C., Malawista S.E., de Boisleury Chevance A., Zhang K., Conly J., Kubes P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking *in vivo*. *Nat. Med.*, 2012, Vol. 18, no. 9, pp. 1386-1393.

61. Zivkovic M., Poljak-Blazi M., Egger G., Sunjic S.B., Schaur R.J., Zarkovic N. Oxidative burst and anticancer activities of rat neutrophils. *Biofactors*, 2005, Vol. 24, no. 1-4, pp. 305-312.

---

**Авторы:**

**Абакумова Т.В.** — к.б.н., доцент, доцент кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Генинг Т.П.** — д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Долгова Д.Р.** — к.б.н., доцент, доцент кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Антонеева И.И.** — д.м.н., доцент, профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

**Песков А.Б.** — д.м.н., профессор, декан факультета постдипломного медицинского и фармацевтического образования ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Генинг С.О.** — аспирант кафедры онкологии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

**Authors:**

**Abakumova T.V.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Gening T.P.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Dolgova D.R.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Antoneeva I.I.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Oncology and Radiology, Ulyanovsk State University; Regional Center of Clinical Oncology, Ulyanovsk, Russian Federation

**Peskov A.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Dean, Faculty of Postgraduate Medical and Pharmaceutical Education, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Gening S.O.**, Postgraduate Student, Department of Oncology and Radiology, Ulyanovsk State University; Regional Center of Clinical Oncology, Ulyanovsk, Russian Federation

---

Поступила 30.01.2019

Отправлена на доработку 11.03.2019

Принята к печати 05.04.2019

---

Received 30.01.2019

Revision received 11.03.2019

Accepted 05.04.2019