

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Ульяновский государственный университет»

На правах рукописи

УДК 616-092.18:571.27:616-006.6

АБАКУМОВА ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ ВО
ВЗАИМОСВЯЗИ С ЦИТОКИНАМИ ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ
ОПУХОЛЕЙ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
Генинг Т.П., профессор, доктор
биологических наук

Ульяновск - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

	С.
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 – Краткая характеристика нейтрофильных гранулоцитов в норме, особенности строения, функционально-метаболических реакций, цитокинорегуляция нейтрофилов	15
1.2 – Характеристика доброкачественных новообразований органов женской репродуктивной системы	23
1.3 – Характеристика злокачественных новообразований органов женской репродуктивной системы	26
1.4 – Характеристика нейтрофильных гранулоцитов на разных стадиях рака органов женской репродуктивной системы, специфика строения клетки, функционально-метаболических реакций, цитокинопродукции и цитокинорегуляции	35
ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
2.1 – Общая характеристика обследуемых	47
2.2 – Лабораторные исследования периферической крови	51
2.3 – Цитохимические методы исследования	52
2.3.1 – Определение параметров внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов в спонтанном и индуцированном тесте с нитросиним тетразолием (НСТ-тесте)	52
2.3.2 – Метод определения активности миелопероксидазы в нейтрофилах	52
2.3.3 – Метод определения фагоцитарной активности клеток	53
2.4 – Методы флуорисцентной микроскопии в оценке рецепторного аппарата нейтрофилов и внеклеточных нейтрофильных ловушек	53
2.4.1 – Иммунофенотипирование нейтрофилов	53
2.4.2 – Оценка внеклеточных нейтрофильных ловушек	53
2.5 – Метод атомно-силовой микроскопии в определении ригидности и топологии мембраны нейтрофилов	54

2.6 – Метод иммуноферментного анализа для изучения уровня внутри- и внечелюстной концентрации цитокинов	55
2.7 – Статистические методы обработки полученных данных	55
ГЛАВА 3 – СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ И НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАКА ЯИЧНИКОВ	58
3.1 – Оценка нейтрофильно-лимфоцитарного отношения, ригидности мембраны и экспрессии дифференцировочных антигенов нейтрофилов периферической крови пациентов с раком яичников	58
3.2 – Показатели кислородзависимого киллинга нейтрофилов периферической крови при доброкачественных опухолях и раке яичников	62
3.3 – Нейтрофильные внечелюстные ловушки нейтрофилов при доброкачественных опухолях и раке яичников	64
3.4 – Уровень про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, NF- κB, нейтрофильной эластазы, васкулоэндотелиального фактора, матриксных металлопротеиназ в лизате нейтрофилов при доброкачественных опухолях и раке яичников	65
3.5 – Уровень цитокинов, васкулоэндотелиального фактора, нейтрофильной эластазы и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови при доброкачественных опухолях и раке яичников	72
3.6 – Маркеры дифференцировки на этапе первичной диагностики злокачественных новообразований яичников и доброкачественных солидных опухолей	78
Список работ, опубликованных по результатам 3-й главы	81
ГЛАВА 4 – СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ДИСПЛАЗИИ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ	85
4.1 – Оценка нейтрофильно-лимфоцитарного отношения, ригидности мембраны и экспрессии дифференцировочных антигенов нейтрофилов в	85

периферической крови пациенток на разных стадиях цервикальной интраэпителиальной неоплазии	
4.2 – Показатели кислородзависимого киллинга нейтрофилов периферической крови при дисплазии и раке шейки матки	89
4.3 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки при цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) и на разных стадиях рака шейки матки	91
4.4 – Уровень про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, NF- κ B, нейтрофильной эластазы, васкулоэндотелиального фактора, матриксных металлопротеиназ в лизате нейтрофилов при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и на разных стадиях рака шейки матки	93
4.5 – Уровень цитокинов, васкулоэндотелиального фактора, нейтрофильной эластазы и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови пациентов при CIN и раке шейки матки	100
4.6 – Маркеры дифференцировки на этапе первичной диагностики рака шейки матки и CIN	107
Список работ, опубликованных по результатам 4-й главы	109
ГЛАВА 5 – СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ МИОМЕ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА ТЕЛА МАТКИ	114
5.1 – Оценка нейтрофильно-лимфоцитарного отношения, ригидности мембраны и экспрессии дифференцировочных антигенов нейтрофилов в периферической крови пациентов при миоме и на разных стадиях рака тела матки	114
5.2 – Показатели кислородзависимого киллинга нейтрофилов периферической крови пациентов с миомой и раком тела матки	117
5.3 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки при миоме и на разных стадиях рака тела матки	119
5.4 – Уровень про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, NF- κ B, нейтрофильной эластазы, васкулоэндотелиального фактора,	120

матриксных металлопротеиназ в лизате нейтрофилов пациентов при миоме и раке тела матки	
5.5 – Уровень цитокинов, васкулоэндотелиального фактора, нейтрофильной эластазы и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови пациентов с миомой и раком тела матки	128
5.6 – Маркеры дифференцировки на этапе первичной диагностики рака тела матки и миомы	134
Список работ, опубликованных по результатам 5-й главы	137
ГЛАВА 6 – РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ЦИТОКИНОВ И ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЯИЧНИКОВ, В ПРОГРЕССИИ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИИ, ПРИ МИОМЕ И РАКЕ ТЕЛА МАТКИ	139
6.1 – Регрессионный анализ взаимосвязи цитокинов семейства IL-1 (IL-1 β , IL-1RA, IL-18) и показателей циркулирующих нейтрофилов при опухолях женской репродуктивной системы	139
6.2 – Регрессионный анализ взаимосвязи IL-6 и показателей циркулирующих нейтрофилов при опухолях женской репродуктивной системы	144
6.3 – Регрессионный анализ взаимосвязи гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и показателей циркулирующих нейтрофилов при онкогинекологической патологии	146
6.4 – Регрессионный анализ взаимосвязи интерферона гамма (IFN γ) и показателей циркулирующих нейтрофилов пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями органов женской репродуктивной системы	148
6.5 – Регрессионный анализ взаимосвязи IL-17 и показателей циркулирующих нейтрофилов при доброкачественных и злокачественных опухолях яичников, в прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии, при миоме и раке тела матки	150

6.6 – Регрессионный анализ взаимосвязи цитокинов семейства IL-2 (IL-2, IL-4) и IL-10 и показателей циркулирующих нейтрофилов при прогрессировании рака яичников, шейки и тела матки	153
6.7 – Регрессионный анализ взаимосвязи хемокинов (IL-8 и MCP-1) и показателей циркулирующих нейтрофилов при доброкачественных и злокачественных опухолях яичников и тела матки, в прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии	159
6.8 – Регрессионный анализ взаимосвязи TNF α и показателей циркулирующих нейтрофилов при неопластических процессах в органах женской репродуктивной системы	161
6.9 – Регрессионный анализ взаимосвязи нейтрофильной эластазы и показателей циркулирующих нейтрофилов при онкогинекологической патологии	163
6.10 – Регрессионный анализ взаимосвязи васкулоэндотелиального фактора роста и показателей циркулирующих нейтрофилов при прогрессировании рака яичников, шейки и тела матки	166
6.11 – Регрессионный анализ взаимосвязи матриксных металлопротеиназ, тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 и показателей циркулирующих нейтрофилов пациентов при доброкачественных и злокачественных опухолях яичников и тела матки, в прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии	167
Список работ, опубликованных по результатам 6-й главы	171
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	173
ВЫВОДЫ	186
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	188
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	189
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	191

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Рак органов женской репродуктивной системы, а именно рак шейки матки (РШМ), рак тела матки (РТМ) и рак яичников (РЯ) - являются определяющими локализациями по заболеваемости и смертности от рака во всем мире [211]. Реакция организма, в котором формируется и развивается опухоль, предполагает системный ответ, связанный с перестройкой популяции циркулирующих лейкоцитов, а именно, с изменением соотношения пулов лимфоцитов и нейтрофилов (Нф) [293]. Показана прогностическая ценность нейтрофильно-лимфоцитарного отношения (NLR) в оценке локализованных и метастатических злокачественных опухолей различных локализаций [261, 277]. Значимая роль в противоопухолевом ответе организма отводится клеточному иммунитету, опосредованному НК-клетками, макрофагами, фибробластами, эндотелиоцитами, перицитами и специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами [341]. Однако Нф первыми мигрируют в очаг развития опухоли на ранних стадиях канцерогенеза и являются активными компонентами стромы [77, 157]. Помимо этого, установлена способность Нф к выраженному цитотоксическому действию на опухолевые клетки [224]. Нф играют важную роль, связывая воспаление и рак, участвуя в процессах, так называемого, “опухолеассоциированного воспаления” - одного из основополагающих процессов канцерогенеза [157].

Продуцируемые опухолью цитокины рекрутируют Нф через NF- κ B зависимый сигнальный путь [113, 164, 236]. Мобилизация Нф из костного мозга в опухолевые очаги происходит в три фазы: экспансию и созревание зрелых Нф в костном мозге, интравазацию в кровотоки через прикрепление к эндотелиальным клеткам и хемотаксическое перемещение Нф к опухолевым очагам [135]. Цитокины и хемокины, такие как G-CSF, CXCR2 и IL-17, продуцируемые клетками микроокружения опухоли, регулируют пролиферацию и созревания Нф в костном мозге [94, 174]. Нф способны

синтезировать цитокины *de novo* или секретировать их из предварительно сформированного резерва [216]. Множественные секреторные пути позволяют регулировать высвобождение разнообразных медиаторов [314]. В процессе онкогенеза Нф изменяют свой фенотип. Было показано, что Нф человека экспрессируют и продуцируют многие цитокины (в частности, TNF α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6), хемокины - CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL23, колониестимулирующие и ангиогенные факторы (например, G-CSF и VEGF), члены семейства TNF (такие как, TRAIL, FasL и BAFF) и факторы роста, которые вызывают гибель/пролиферацию раковых клеток, а также стимулируют ангиогенез и метастазирование [21, 167, 321].

Известно, что при неопластических процессах изменяется состав и количество рецепторов на поверхности Нф. При этом нарушается способность к хемотаксису, процессам адгезии и миграции [36]. При возникновении и развитии рака Нф демонстрируют фенотипическую и функциональную гетерогенность [300]. Нф выполняют свои функции благодаря высвобождению ферментов и протеаз посредством дегрануляции, секреции активных форм кислорода, фагоцитоза и уничтожения патогенов внутри фагосомы, а также секреции эухроматической ДНК в форме NET [324]. Образование последних имеет место при развитии злокачественных образований [64] и способствует инвазии и миграции раковых клеток [281]. Изучением фенотипа Нф в динамике опухолевой прогрессии занимается ряд научных коллективов как в России, так и за рубежом [8, 10, 20, 23, 31, 35, 150, 307], поскольку выявление факторов и маркеров смены противоопухолевого фенотипа (N1) на проопухолевый (N2) позволит резко и значимо корректировать схемы иммунотерапии при различных типах неоплазмы.

Вопрос о происхождении Нф в микросреде опухоли и возможности поляризации гранулоцитов вне опухоли или после инфильтрации опухоли остается актуальным в настоящее время. При участии циркулирующих цитокинов Нф меняют статус с противо- на протективноопухолевый, при этом они высвобождают цитокины, хемокины, ангиогенные факторы и факторы

роста, способствуя прогрессированию злокачественных опухолей женской репродуктивной системы.

Цель настоящей работы - оценить количественно-функциональное состояние циркулирующих нейтрофилов во взаимосвязи с цитокинами при прогрессировании злокачественных опухолей женской репродуктивной системы.

Основные задачи исследования:

1. Используя метод регрессионного анализа, определить роль циркулирующих цитокинов в праймировании нейтрофилов и участие ядерного фактора-каппаВ в регуляции продукции нейтрофилокинов при доброкачественных опухолях и раке яичников, дисплазии и раке шейки матки, миоме и раке тела матки.

2. Оценить связь ригидности мембраны нейтрофилов и их адгезионную способность с уровнем циркулирующих цитокинов при доброкачественных опухолях и раке яичников, дисплазии и раке шейки матки, миоме и раке тела матки.

3. Выявить взаимосвязь киллинговой активности нейтрофилов и циркулирующих цитокинов при доброкачественных опухолях и раке яичников, дисплазии и раке шейки матки, миоме и раке тела матки.

4. Методом регрессионного анализа оценить возможность взаимосвязи кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и уровня циркулирующих цитокинов при доброкачественных опухолях и раке яичников, дисплазии и раке шейки матки, миоме и раке тела матки.

5. Оценить роль цитокинов крови в реализации способности циркулирующих нейтрофилов к апоптозу и формированию внеклеточных ловушек (NETos) при доброкачественных опухолях и раке яичников, дисплазии и раке шейки матки, миоме и раке тела матки в модели линейной регрессии.

6. Методом корреляционного анализа выявить ассоциацию нейтрофилокинов с ангиогенной и киллинговой функцией нейтрофилов при

доброкачественных опухолях и раке яичников, дисплазии и раке шейки матки, миоме и раке тела матки.

7. Определить критерии изменения функционально-метаболического состояния нейтрофилов и цитокинов периферической крови, позволяющие проводить раннюю диагностику злокачественных новообразований женской репродуктивной системы.

Научная новизна. Получены новые данные о взаимосвязи концентраций уровня циркулирующих цитокинов, хемокинов, протеиназ с морфо-функциональными характеристиками нейтрофилов при доброкачественных опухолях яичников, на ранних (I-II) и распространенных (III и IV) стадиях рака яичников, при дисплазии и при начальном (Ia), местноограниченном (Ib-IIa), распространенном (IIb-IV) стадиях рака шейки матки, при миоме матки и при местном (I) и распространенном (II-III) раке тела матки.

Впервые были изучены и проанализированы особенности рецепторного статуса, ригидности мембраны и топологии нейтрофилов при предраковом состоянии и прогрессировании злокачественных опухолей органов женской репродуктивной системы.

Полученные результаты позволяют дополнить и расширить представления о способности нейтрофилов периферической крови формировать внеклеточные ловушки (NET), их киллинговую активность, ассоциацию NETs с активностью ядерного фактора (NF- κ B) и нейтрофилокинами при прогрессировании опухолей женской репродуктивной системы.

Впервые дан анализ уровня внутриклеточно синтезируемых нейтрофилами цитокинов, хемокинов, протеиназ и выявлены корреляционные связи концентрации медиаторов с васкулоэндотелиальным фактором роста (VEGF) при доброкачественных опухолях яичников и на всех стадиях рака яичников, при дисплазии и на разных стадиях рака шейки матки, при миоме и при раке тела матки.

Разработана гипотеза взаимосвязи синтезируемых нейтрофилами цитокинов, хемокинов, протеиназ, ангиогенных факторов и активности NF- κ B в гранулоцитах.

Впервые с использованием метода бинарной логистической регрессии показана возможность дифференцировать рак яичников от доброкачественных опухолей яичников, рак шейки матки от дисплазии шейки матки, рак тела матки от миомы на основании показателей концентрации циркулирующих в крови цитокинов (IL-1 β , G-CSF, IL-17A, IFN γ , IL-2, IL-1RA, IL-6, MCP-1) и активности миелопероксидазы, активных форм кислорода, IFN γ , IL-8, NE, MCP-1 и индекса ловушек нейтрофилов.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе представлена гипотеза об участии циркулирующих цитокинов в формировании проопухолевого фенотипа нейтрофилов при раке яичников, шейки и тела матки, а также при доброкачественных опухолях яичников, цервикальной интраэпителиальной неоплазии и миоме матки. Полученные данные позволяют сформулировать морфофункциональный портрет нейтрофилов крови при предраковых и доброкачественных опухолях женской репродуктивной системы. Полученные результаты могут быть использованы при изучении механизмов канцерогенеза в фундаментальной онкологии, в образовательном процессе курсов патофизиологии, клинической и фундаментальной онкологии, при разработке схем диагностики и лечения прогрессирующего рака яичников, шейки и тела матки.

Положения, выносимые на защиту:

1. Характеристика циркулирующих нейтрофилов и участие циркулирующих в периферической крови цитокинов в формировании проопухолевого фенотипа нейтрофилов определяется местом локализации первичной опухоли и стадией патологического процесса.

2. Киллинговая активность и изменение ангиогенных функций нейтрофилов ассоциируется с комплексом нейтрофилокинов, в зависимости от локализации первичной опухоли и стадии процесса.

3. Маркерами дифференциальной диагностики рака яичников и доброкачественных опухолей яичников могут служить уровень IL-1 β , G-CSF и IL-17A в сыворотке крови, активность миелопероксидазы, продукция перекисных радикалов, уровень IFN γ в нейтрофилах; рака шейки матки и дисплазии - концентрация G-CSF, IFN γ , IL-2 в сыворотке крови, уровень IL-8 и NE в нейтрофилах и индекс ловушек; рака тела матки и миомы - IL-1RA, IL-6 в сыворотке крови, а также циркулирующий и внутриклеточный MCP-1, индекс ловушек нейтрофилов.

Внедрение результатов исследования в практику. Полученные данные внедрены в практику работы иммунологического отдела Научно-исследовательского медико-биологического центра ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» для использования в качестве референсных значений уровня цитокинов в сыворотке крови и лизате нейтрофилов пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями женской репродуктивной системы. Также результаты исследования используются в учебном процессе кафедр: 1) онкологии и лучевой диагностики, 2) последипломного образования и семейной медицины, 3) физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» при изучении раздела о неспецифическом иммунитете. Значение полученных результатов исследования для практики также подтверждено разработанными способами дифференциальной диагностики рака шейки матки (Патент РФ №2488823 от 27.07.2013), уточнения стадии распространенного рака шейки матки (Патент РФ №2582979, 06.04.2016).

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на конференциях различного уровня: VII Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2012), VII научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Завадские чтения» (Ростов-на-Дону, 2012), Meeting Biophotonics and Immune Responses VII SPIE (San Francisco, California, 2012), Глобальном онкологическом форуме EAFO

(Москва, 2012), Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2013), Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2013), VIII Всероссийском съезде онкологов «Петровские чтения-2013» (Санкт-Петербург, 2013), XXII Съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Москва-Волгоград, 2013), Международном форуме «Клиническая иммунология и аллергология-междисциплинарные проблемы» (Казань, 2014), IX Международной (XVIII Всероссийской) Пироговской научно-медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2014), X Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научно-медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2015), Всероссийской конференции с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека» (Ульяновск, 2016), Объединенном иммунологическом форуме (Новосибирск, 2019), Virtual Congress on Molecular Analysis for Precision Oncology (Lugano–Switzerland, 2020, 2021), Immuno-Oncology Congress of the European-Society-for-Medical-Oncology (Geneva, Switzerland, 2019, 2020), ESCI Virtual Meeting 2020 – COVID Edition (Netherlands, 2020), American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting (USA, 2021), 55TH ANNUAL SCIENTIFIC MEETING-ESCI virtual meeting 2021 (Netherlands, 2021), ESMO Congress 2021 (Paris, France, 2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 54 печатных работы, из них 25 – в изданиях, рецензированных ВАК, 17 – в цитируемых международных реферативных базах данных Scopus и Web of Science, 3 – монографии, получено 2 патента.

Объем и структура диссертации. Научная работа состоит из введения, глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Диссертация изложена на 231 странице, иллюстрирована 45 рисунками и 38

таблицами. В «Списке используемой литературы» содержится 375 источников, из которых 339 - иностранные.

Личное участие автора. Диссертация выполнена в соответствии с планом научной работы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». Планирование научной работы, постановка цели и задач проводились совместно с научным консультантом, д.б.н., профессором Т.П. Генинг. Автор принимала непосредственное личное участие в подготовке и проведении исследования, обработке и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций. С 2011 по 2021 годы выступала с докладами на международных и российских конференциях. Атомно-силовая микроскопия выполнена совместно с инженером-исследователем лаборатории зондовой и электронной микроскопии научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (зав. лабораторией – к.ф.-м.н. Е.С. Махмутова). Подбор тематических больных производился при участии д.м.н., доцента, профессора кафедры онкологии и лучевой диагностики медицинского факультета им. Т.З.Биктимирова УлГУ Антонеевой И.И.

ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящее время нейтрофилы (Нф) считаются сложными клетками, способными выполнять широкий спектр специализированных функций, и в качестве эффектора врожденного иммунного ответа они могут регулировать многие процессы, такие как острое повреждение и восстановление, рак и хронические воспалительные процессы. В связи с многочисленными новыми функциями Нф, интересно посмотреть, что в настоящее время известно и понять, какой информации не хватает.

1.1 – Краткая характеристика нейтрофильных гранулоцитов в норме, особенности строения, функционально-метаболических реакций, цитокинорегуляция нейтрофилов

Нф – фагоцитирующие клетки, обеспечивающие быструю нейтрализацию патогенов, а также осуществляющие прямую и антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) [125]. В состоянии покоя циркулирующие Нф характеризуются округлой формой с минимальной транскрипционной активностью и ограниченной способностью реагировать на активирующие раздражители [261], являются преобладающим видом лейкоцитов в периферической крови людей и составляют 40-70% от всех циркулирующих клеток этого типа [3].

В настоящее время Нф считаются антигенпрезентирующими клетками (АПК), способными синтезировать и секретировать цитокины, хемокины, ростовые факторы и различные пептиды [22, 141]. Белки, которые способствуют уничтожению микробов при освобождении фагосом или внеклеточно, плотно упакованы в гранулы [102, 245]. Выделяют три основных типа гранул – первичные (азурофильные), вторичные (специфические), третичные (желатиназные), а также секреторные везикулы. Секреторные везикулы создаются эндоцитозом, в то время как третичные, вторичные и

первичные гранулы образуются из сети Гольджи при созревании Нф [328]. Азурофильные гранулы содержат белки и пептиды, обладающие микробицидными свойствами, такие как МПО, гемосодержащий фермент, который образует одну из систем генерации активных форм кислорода (АФК), а также нейтральный протеиназы: катепсин G, дефенсины, эластаза, протеиназа 3, азуроцидин, фактор BPI (bactericidal/permeability-increasing), лизоцим [203]. В основном, этот тип гранул содержит катионные белки, связанные с сульфатными протеингликанами на внутренней поверхности азурофильных гранул, находясь в инактивированном состоянии [232]. В работе Perera N.C. (2013), описан белок NSP4, который полностью обрабатывается и сохраняется как уже активированный фермент в азурофильных гранулах Нф. Специфические гранулы содержат маркерный белок лактоферрин, который катализирует образование гидроксил-радикала [367]. IL-2 способствует высвобождению лактоферрина в норме [134]. Также специфические гранулы содержат щелочную фосфатазу, кобалофилин, активатор плазминогена, коллагеназу, липокалин, желатиназу [86, 87]. Последняя облегчает миграцию Нф в окружающие ткани. Коллагеназа расщепляет коллаген, что способствует движению Нф к очагу повреждения. Дефицит специфических гранул вызывает нарушение миграции Нф [86]. Секреторные везикулы наиболее мобильные, содержат запас мембранных компонентов [123], щелочную фосфатазу, рецептор к пептидному продукту бактерий N-формилметионил-лейцилфенилаланин (fMLP), рецептор к компоненту системы комплимента CR1 [281]. Лизосомы, выделяемые в качестве отдельного гранулярного компартмента, содержат кислые гидролазы [48]. Ферментные и неферментные системы Нф формируются на ранних этапах миелопоэза [15]. Содержимое гранул может выбрасываться внутрь фагосомы или посредством экзоцитоза в межклеточное пространство. Показано, что продукты гранул Нф обладают цитолитическим действием, регулируют функции самих Нф и других клеток по паракринным и аутокринным механизмам [369]. Секреторные везикулы подвергаются

экзоцитозу более легко и полностью, по сравнению с гранулами желатиназы. Этот процесс стимулирует фактор некроза опухоли- α (TNF α) [123]. Специфические и азурофильные гранулы, содержащие токсичные антимикробные компоненты, могут участвовать в ограниченном экзоцитозе [142].

Выполняя свои физиологические функции, Нф характеризуются высокой морфологической пластичностью, подвергаются значительным внешним перестройкам. Нф являются клетками с богатым деструктивным потенциалом [27]. Под действием провоспалительных цитокинов модифицируется экспрессия рецепторов Нф к эндотелиальной клетке. Действие TNF α увеличивает экспрессию на плазматической мембране рецептора интегрин $\beta 2$, CD11b/CD18, посредством экзоцитоза секреторных везикул; уменьшает экспрессию селективного рецептора CD62-L; и индуцирует устойчивую активацию CD11b/CD18 [133]. Это способствует захвату циркулирующих Нф и их адгезии с последующей миграцией их в ткани, где они живут 1-2 дня и реализуют свою основную функцию – фагоцитоз [130]. IL-2 влияет на миграцию Нф и активацию на их поверхности CD11b и CD18 *in vitro* [40].

Комплексное рассмотрение морфофункциональных особенностей Нф выполняется при помощи атомно-силовой микроскопии (АСМ), позволяющей отказаться от использования жестких методов фиксации, и тем самым минимально травмировать клетки. Используя АСМ, можно прямым образом измерить величину механической жесткости объекта, получить трехмерную картину поверхности. Для Нф исследование механических свойств имеет первостепенное значение, поскольку процессы диапедеза и миграции в тканях и процесс фагоцитоза сопровождаются комплексными упруго-механическими реакциями.

Помимо рецепторных взаимодействий, которые к настоящему времени достаточно полноценно исследованы и охарактеризованы, в рекогносцировочных реакциях нейтрофилов большое значение принадлежит

перестройкам цитоскелета, активации хемо- и механорецепторов [290]. Нф имеют сложную систему актинового цитоскелета, которая очень важна для осуществления процессов хемотаксиса, фагоцитоза и экзоцитоза. С использованием АСМ был обнаружен новый тип гибели – мумификация, которая сопровождается увеличением жесткости мембраны Нф и получением характерной ухабистой формы с многочисленными выпячиваниями [30].

Функциональные димеры ядерного фактора-карраВ (NF-κB) - p50 (NFκB1), p65 (RelA) и/или c-Rel обнаруживаются в нейтрофилах, и их активность индуцируется широким спектром провоспалительных медиаторов [196]. Семейство IL-17 передает сигналы через соответствующие рецепторы и активирует NF-κB, индуцируя экспрессию антимикробных пептидов, цитокинов и хемокинов [154]. TNFα активирует NF-κB как в циркулирующих, так и в адгезированных Нф [183]. Мобилизация нейтрофилов из костного мозга контролируется p50/p65 и включает индуцированную NF-κB экспрессию транскрипционного фактора С/EBPa [364]. NF-κB поддерживает выживание Нф и блокирует спонтанный апоптоз, который вызывает гибель их через образование NET [310]. Используя комбинации флуоресценции и АСМ, исследователи Pires R.H. et al. (2016) показали, что NETs работают как микроскопические механические сита с эластичными свойствами, которые основаны на их ДНК-белковой структуре, способной разделять частицы в зависимости от их размера [288].

Главная функция Нф – фагоцитоз. Нф фагоцитируют опсонизированные (рецептор-опосредованный фагоцитоз) и неопсонизированные частицы [131]. Акт фагоцитоза состоит из нескольких стадий: хемотаксис, адсорбция, инвагинация, лизис [356]. Рецептор-опосредованный фагоцитоз происходит при участии рецепторов распознавания образов, рецепторов, связанных с белками G, и опсонических рецепторов [332]. Эти рецепторы могут распознавать связанные с микробами молекулярные структуры и белки «хозяина» (такие как IgG и комплемент) [298]. Иммуноглобулины опосредуют фагоцитарные реакции. IgG активирует классический путь фагоцитоза через

систему комплемента и нейтрализует токсины и другие факторы бактериальной вирулентности. IgM, благодаря своей полимерной природе, особенно эффективен при активации комплемента и опсонизации. В отличие от IgG и IgM, IgA не активирует систему комплемента, действуя как корцептор к FcγRIIA, усиливает фагоцитоз, процессы дегрануляции, окислительного взрыва [233]. Неокислительный фагоцитоз происходит благодаря первичной роли высвобожденных из гранул ферментов в фагосому [222]. Благодаря высокому содержанию NADPH-оксидазы и МПО Нф осуществляют внутрифагосомальный киллинг за счет выработки высоких концентраций как первичных, так и вторичных метаболитов кислорода (O_2^- , HO, H_2O_2 , OCl⁻, OBr²⁻, OJ⁻, OSCN), а также метаболитов азота (NO, NO₂⁻, NO₃⁻, ONOO⁻). Совокупное действие этих молекул инициирует перекисное окисление липидов мембран, разрушение пептидных связей белков и оснований в нуклеиновых кислотах [248, 267]. NADPH-оксидаза имеется у небольшого количества «отдыхающих» циркулирующих Нф [368]. Пространственное разделение мембраны и цитозольных компонентов поддерживает ферментативную бездеятельность покоящихся Нф. При стимуляции цитозольные компоненты транслоцируются на мембрану с образованием каталитически активного ферментного комплекса [361]. По результатам исследований, выполненных Capsoni F. et al. (1997), IL-10 дозозависимо подавлял способность Нф производить АФК, при этом мембранная экспрессия рецепторов, опосредующих фагоцитоз не была изменена цитокином. Установлено, что IL-10 может напрямую снижать способность Нф фагоцитировать и убивать бактерии [208].

Активация Нф сопровождается респираторным взрывом, вызывающим резкую перестройку метаболизма этих клеток [2]. IL-1 является ключевым фактором активации Нф [107]. Под воздействием TNFα активируется путь p38 MAPK за счет усиления транслокации плазматических мембран цитозольных компонентов NADPH-оксидазы и увеличения экспрессии компонентов оксидазы плазматической мембраны [153]. В отличие от TNFα, GM-CSF

индуцирует фосфорилирование Ser345 на p47phox путем активации ERK1/2, а не p38 MAPK [128]. Таким образом, множественные пути передачи сигнала индуцируют одни и те же молекулярные события, необходимые для прайминга. При активации Нф синтезируют воспалительные медиаторы и ферменты, которые опосредуют последующие фенотипические и функциональные изменения. Нф изменяют схему распознавания рецепторов адгезии путем пролиферации селектинов, слияния секреторных везикул с плазматической мембраной, что приводит к усилению экспрессии генов поверхностных рецепторов. Это фенотипическое изменение в сочетании с высвобождением гранул, содержащих матриксные металлопротеазы (ММП), способствует миграции Нф в воспаленные ткани. Процесс прайминга продолжается, когда Нф связываются с белками внеклеточного матрикса. Это приводит к увеличению полимеризации актина, дегрануляции секреторных везикул и внутриклеточной передаче сигналов, что усиливает хемотаксис и хемокинез Нф [231]. ММП-8 и ММП-9, высвобождаемые Нф, способствуют перичеллюлярному протеолизу за счет связывания на поверхности Нф с TIMP [334].

Нф выступают как репрограммеры матрикса. Они способны создавать микросреду, которая более благоприятна для ангиогенеза и регенерации тканей за счет секреции ММП-9 [126]. Кроме того, ММП-2 с ММП-9 *in vivo* усиливает действие CXCL5, способствуя привлечению Нф [312]. ММП-13 в Нф ассоциирован с пролиферацией эндотелиальных клеток и дифференцировкой сосудов [119].

Фенотипические изменения, связанные с праймированием, продлевают продолжительность жизни Нф путем активации адгезии, антиапоптотических путей передачи сигнала и факторов транскрипции [231]. Как правило, праймированные Нф демонстрируют повышенную способность к экзоцитозу, образованию NET и хемотаксису, генерации большого количества АФК [39, 168]. Последний регулирует внутриклеточные сигнальные пути, клеточный цикл, развитие апоптоза [106, 363]. Однако кислородзависимый механизм не

является системой жизнеобеспечения Нф, которые отлично переносят гипоксию и нормально выполняют ряд функций в условиях анаэробнозиса [24]. При помощи респираторного взрыва Нф решает эффекторные задачи. Высокие концентрации H_2O_2 обладают способностью ингибировать синтез ДНК, а также активировать апоптоз [160]. АФК активирует белки Ras, играющие важную роль в передаче сигналов в ядро клетки [309]. Накопление АФК приводит к накоплению транскрипционного фактора NF- κ B, индуцирующего синтез ряда цитокинов и рецепторов, участвующих в иммунном ответе [309, 240].

Нф секретирует большой спектр провоспалительных (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-9, IL-17A, IL-17F, IL-16, IL-18, фактор торможения миграции макрофагов (MIF)) и противовоспалительных (IL-1RA, IL-4, IL-10, трансформирующие факторы роста (TGF β 1, TGF β 2), иммунорегуляторных цитокинов (IFN α , IFN γ , IL-12, IL-23), колониестимулирующих факторов (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3), ангиогенных и фиброгенных факторов (гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста фибробластов (FGF2), TGF α , VEGF, prokineticin 2), членов суперсемейства TNF, CXC- и CC-хемокинов, других цитокинов (amphiregulin, мозговой нейротрофический фактор (BDNF), midkine, фактор роста нервов (NGF), нейротрофин (NT4), oncostatin M), различных регуляторных белков [22, 221, 233, 308, 311, 141]. Цитокины могут накапливаться во внутриклеточных компартментах после синтеза *de novo* либо зрелыми клетками [152], либо в период их созревания в костном мозге [139]. И могут храниться в Нф до определенного момента. Уровень цитокинов, продуцируемых Нф, зависит от активации транскрипционных факторов, таких как NF- κ B и сигнальных преобразователей и активаторов транскрипции (STAT) [226].

Свои функции Нф осуществляют благодаря мощному рецепторному аппарату. Сохранение пула рецепторов происходит внутриклеточно на мембране секреторных везикул, желатиназных и специфических гранул Нф, а

под воздействием активаторов рецепторы транслоцируются на поверхностную мембрану [112].

Мембранная ассоциация CD11b/CD18 Нф с МПО индуцирует каскад внутриклеточной передачи сигналов, приводящей к регулированию дегрануляции Нф, экспрессии и активности NADPH-оксидаз аутокринным способом. Эти рецепторы также важны для передачи сигналов, опосредованных различными цитокинами, модулируя активацию Нф. TNF индуцирует реорганизацию цитоскелета в Нф способствует проявлению адгезивных свойств [336].

FcγRIII-рецепторы (CD16) сохраняются на мембране секреторных гранул. Их экспрессия снижена на мембране апоптотических Нф. Рецепторы для хемоаттрактантов, рецепторы для хемокинов (CXCR1, CXCR2, CCR1); CD24 участвует в клеточной пролиферации и дифференцировке; экспрессия CD32 снижена на Нф, вступивших в апоптоз. Стимуляция CD89 может приводить к активации окислительного взрыва, секреции цитокинов, фагоцитоза. CD95 – рецептор активации/индукции апоптоза; CD25 – рецептор к IL-2, который является активационным маркером Нф [19, 29, 48, 82, 221].

Нф при участии цитокинов проходят различные стадии активации и дифференцировки и имеют многочисленные рецепторы к цитокинам (IL-8, TNFα, IL-1, IL-2, IL-15, IL-17, IFNα, IFNγ, G-CSF, GM-CSF) [299]. Экспрессия мембранных рецепторов Нф не только отражает процессы, происходящие в течение жизненного цикла клетки, но и по реорганизации поверхностной цитоплазматической мембраны Нф позволяет оценить их функциональное праймирование. Мембранные рецепторы Нф обеспечивают взаимосвязь с другими клетками иммунной системы и с микроокружением [68, 80, 129, 132].

Различные фенотипические профили и уровень оснащённости поверхностными рецепторами связаны с морфологическими особенностями и определяет функциональный потенциал Нф – цитокинопродукцию, трансэндотелиальную миграцию, внутриклеточный и внеклеточный киллинг, образование NET [9, 33, 259]. NET образуется и реализует свои действия в

момент активной смерти Нф. Сетевые структуры появляются после дезинтеграции ядерной оболочки и гранулярных мембран. При этом морфология органелл и цитоплазмы не изменяется. Формирование NET зависит от наработки АФК через активацию NADPH-оксидазы Нф [120]. NETosis отличается от апоптоза и некроза деконденсацией хроматина и дезинтеграцией ядерной оболочки, исчезновением цитоплазматических гранул и смешиванием ядерного содержимого с материалом цитоплазмы [16, 332]. Цитотоксический потенциал Нф, сконцентрированный в гранулах и везикулах при формировании NET, высвобождается либо в фагоцитарные вакуоли, либо во внеклеточное пространство [233]. Важнейшим компонентом нейтрофильных ловушек считается NE [302, 362], расщепляющая при дегрануляции ядерные гистоны (H1, H4) и запускающая, таким образом, процесс деконденсации хроматина активированных Нф, необходимый для формирования NETs [105].

Таким образом, Нф представляют собой гораздо более сложные клетки, чем предполагалось ранее, обладающие не только эффекторными функциями врожденного иммунного ответа, но также и способностью модулировать адаптивный иммунный ответ посредством прямого взаимодействия с цитокинами [197, 282]. Установлено, что Нф, как АПК, способны к дифференцировке и активации ядра – реструктуризации хроматина [20, 25], экспрессии многочисленных генов, секреции хемокинов, ростовых факторов, различных пептидов, в том числе, участвующих в формировании NET [340].

1.2 – Характеристика доброкачественных новообразований органов женской репродуктивной системы

Известно, что доброкачественные опухоли могут появляться в любом месте женских половых органов: в яичниках, матке и влагалище, однако, наиболее распространенными являются опухоли яичников (кистомы) и матки (фибромиомы).

Опухоли яичников продолжают оставаться одной из наиболее часто встречающихся гинекологических патологий, занимающих второе место в структуре новообразований женской репродуктивной системы [371]. Ежегодно в мире регистрируется более 165 тыс. случаев впервые выявленных новообразований яичников. По данным современных исследователей, в структуре образований яичников доброкачественные опухоли составляют 70-80%. Доброкачественные опухоли яичников (ДОЯ) – группа патологических дополнительных образований овариальной ткани, возникающих в результате нарушения процессов клеточной пролиферации и дифференцировки [158].

Вопрос об этиологии ДОЯ остается дискуссионным. Различные теории рассматривают в качестве этиологических причин возникновения: гормональную, вирусную, генетическую природу овариальных опухолей. Что касается структуры отдельных гистотипов ДОЯ, то наиболее распространенными вариантами являются опухоли эпителиального происхождения и герминогенные опухоли [156]. Обширную группу опухолей эпителиального генеза представляют серозные и муцинозные цистаденомы [213]. Распространенность гладкостенных серозных цистаденом в популяции, по имеющимся данным, варьирует от 16 до 70 %. Удельный вес папиллярных серозных цистаденом составляет 15% - 22% наблюдений. Данный морфологический вариант обладает наибольшим потенциалом к малигнизации, составляя более 50% [354]. На долю муцинозных цистаденом приходится 14 % - 19 % опухолей [70].

Пограничные опухоли яичников — это новообразования с атипичной пролиферацией эпителия без деструктивной стромальной инвазии. Пограничные опухоли имеют общие морфологические признаки с аденокарциномой яичников: для них характерна митотическая активность, ядерная атипия, папиллярные разрастания. Основным отличием от злокачественного процесса является отсутствие стромальной инвазии, за исключением случаев микроинвазии, что является определяющим относительно благоприятного прогноза [158].

Миома матки является наиболее частой доброкачественной опухолью гениталий, занимая в структуре гинекологической заболеваемости второе место после воспалительных процессов матки и придатков [34]. Она представляет собой доброкачественную опухоль моноклонального происхождения, развивающуюся из гладкомышечных клеток шейки или тела матки [7].

Распространенность миомы матки составляет 12-25% от всех гинекологических заболеваний и достигает максимальных значений в позднем репродуктивном и пременопаузальном периоде [32].

Важную роль в патогенезе миомы играет неоангиогенез, который активируется при опухолевом росте. Формирование новой системы кровоснабжения дает возможность опухоли расти. Процесс неоангиогенеза также необходим для адаптации тканей в условиях повреждения. Главным механизмом регуляции процессов неоангиогенеза является высвобождение ангиогенных факторов, а также цитокинов, под действием которых происходит активация пролиферации эндотелиоцитов, завершающаяся ремоделированием сосуда. Сосудистая сеть опухоли имеет хаотическую организацию с извилистостью и повышенной проницаемостью сосудов [4]. Результаты исследований ряда авторов [93, 283] показали, что гормоны реализуют свои эффекты путем воздействия на сложную систему местных специфических факторов - факторов роста, которые стимулируют или ингибируют деление и дифференцировку клеток миометрия путем изменения их протеолитической активности, а также регулируют процессы апоптоза и являются основными переносчиками митогенного сигнала клетки.

Несомненно, в настоящее время доброкачественные опухоли женской репродуктивной системы представляют одну из актуальных проблем гинекологии. Несмотря на успехи, достигнутые в диагностике и терапии, проблема роли врожденного иммунитета является актуальной и данных о роли нейтрофилов в доступной литературе не обнаружено.

1.3 – Характеристика злокачественных новообразований органов женской репродуктивной системы

Опухоли женских половых путей являются одной из основных причин заболеваемости и смертности среди женщин во всем мире. Рак яичников (РЯ) - смертельное гинекологическое злокачественное новообразование. До настоящего времени основной гипотезой канцерогенеза эпителиального рака оставалась концепция стадийности, согласно которой аденокарцинома эволюционирует, проходя определенные стадии от цистаденомы к пограничной опухоли и далее - к инвазивному раку [242]. В последние годы широкое распространение получила гипотеза, согласно которой аденокарцинома развивается «de novo» непосредственно из поверхностного или инклюзионного эпителия, сразу обладая свойствами злокачественности [206]. Исследования показали, что эпителиальный РЯ не является отдельным заболеванием, а состоит из разнообразной группы опухолей, которые можно классифицировать на основе отличительных морфологических и молекулярно-генетических особенностей. Одна группа опухолей, обозначенная как тип I, состоит из серозных, эндометриоидных, светлоклеточных, муцинозных и переходных (Бреннера) карцином низкой степени злокачественности. Эти опухоли обычно при проявлении ограничиваются яичником и, как группа, являются относительно генетически стабильными образованиями. У них отсутствуют мутации TP53, но каждый гистологический тип демонстрирует отличительный молекулярно-генетический профиль. Более того, карциномы имеют общую линию происхождения с соответствующим доброкачественным кистозным новообразованием, часто через промежуточную стадию (пограничную опухоль), поддерживая морфологический континуум прогрессирования опухоли. Напротив, другая группа опухолей, обозначенная как тип II, очень агрессивна, быстро развивается и почти всегда находится на поздней стадии.

Опухоли типа II включают обычную серозную карциному высокой степени злокачественности, недифференцированную карциному и злокачественные смешанные мезодермальные опухоли (карциносаркому). Они обнаруживают мутации TP53 более чем в 80% случаев и редко содержат мутации, обнаруживаемые в опухолях типа I [207].

При первичной диагностике у 58,5% пациенток обнаруживаются III или IV стадии болезни, поэтому, в среднем, пятилетняя выживаемость при РЯ варьирует от 36 до 46,2%. При этом все попытки разработать скрининговые тесты для РЯ пока не увенчались успехом: неинвазивные и малоинвазивные методы, такие, как ультразвуковое исследование и определение СА-125, не обладают достаточной специфичностью, а клиническое течение заболевания на начальных стадиях чаще всего бессимптомное. Более чем у 95% пациентов с III-IV стадиями по классификации Международной федерации акушеров-гинекологов (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO)) выявляется серозная аденокарцинома, в то время как серозная аденокарцинома I стадии диагностируется редко. Эндометриоидная аденокарцинома считается вторым по распространенности субтипом карциномы яичников (около 10% от всех аденокарцином яичников). Светлоклеточная аденокарцинома составляет 5% от всех типов аденокарцином и, в основном, распространена среди женщин Японии. Большинство эндометриоидных и светлоклеточных аденокарцином выявляются на I или II стадиях (FIGO), а эндометриоидная карцинома является самой распространенной опухолью, выявляемой на первой стадии [270].

В настоящее время определение стадии производится на основании классификации FIGO (2014) и TNM (8-е издание, 2017) (таблица 1) [13].

Таблица 1 – Стадирование рака яичников по TNM (8-е издание, 2017) и FIGO (2014)

TNM	FIGO	Описание
T1	I	Опухоль ограничена яичниками
T1a	IA	Опухоль ограничена одним яичником, капсула не повреждена, нет опухолевых разрастаний на поверхности яичника, нет злокачественных клеток в асцитической жидкости или смывах из брюшной полости
T1b	IB	Опухоль ограничена двумя яичниками, их капсулы не повреждены, нет опухолевых разрастаний на поверхности яичников, нет злокачественных клеток в асцитической жидкости или смывах из брюшной полости
T1c	IC	Опухоль ограничена одним или двумя яичниками и сопровождается любым из следующих факторов
T1c1	IC1	Повреждение капсулы во время операции
T1c2	IC2	Повреждение капсулы до операции или опухоль на поверхности яичника/маточной трубы
T1c3	IC3	Злокачественные клетки в асцитической жидкости или смывах с брюшины
T2	II	Опухоль поражает один или два яичника с распространением на малый таз
T2a	IIA	Врастание и/или метастазирование в матку и/или в одну или обе маточные трубы
T2b	IIB	Распространение на другие ткани таза
T3 и/или N1	III	Опухоль поражает один или оба яичника с гистологически подтвержденными внутрибрюшинными метастазами за пределами таза и/или метастазами в регионарных лимфатических узлах (внутренних, наружных и общих подвздошных, запирательных, крестцовых или поясничных лимфоузлах)
N1	IIIA1	Метастазы только в забрюшинных лимфатических узлах
T3a	IIIA2	Микроскопические, гистологически подтвержденные внутрибрюшинные метастазы за пределами таза с/без метастазов в забрюшинных лимфатических узлах
T3b	IIIB	Макроскопические внутрибрюшинные метастазы за пределами таза до 2 см включительно в наибольшем измерении с/без метастазов в забрюшинных лимфатических узлах
T3c	IIIC	Внутрибрюшинные метастазы за пределами таза более 2 см в наибольшем измерении с/без метастазов в забрюшинных лимфатических узлах (включая распространение опухоли на капсулу печени и селезенки без поражения паренхимы органов)
M1	IV	Отдаленные метастазы (исключая внутрибрюшинные метастазы)
	IVA	Плевральный выпот со злокачественными клетками
	IVB	Метастазы в паренхиматозных органах и других органах вне брюшной полости (в том числе паховых лимфатических узлах и лимфатических узлах за пределами брюшной полости)

Рак шейки матки (РШМ) находится на 4-м месте среди наиболее распространенных видов рака у женщин. К предраковым заболеваниям шейки матки, предшествующим инвазивному РШМ дисплазии эпителия I–III степени выраженности [цервикальная интраэпителиальная неоплазия (Cervical Intraepithelial Neoplasia – CIN) или плоскоклеточные интраэпителиальные поражения (Squamous Intraepithelial Lesion – SIL)].

Предраковые поражения классифицируются как предрак низкой (цервикальная интраэпителиальная неоплазия 1 (CIN1)) или высокой степени (CIN2 и CIN3, вместе именуемые CIN2 +). Аденокарцинома in situ (AIS) - заболевание, предшествующее инвазивному железистому РШМ. Микроинвазивный, или ранний инвазивный, РШМ – инвазивный рак, который имеет наибольшую глубину инвазии ≤ 5 мм и наибольшую протяженность поражения ≥ 7 мм (стадия IA по FIGO) (таблица 2). Это может быть аденокарцинома или плоскоклеточный рак. Микроинвазивная аденокарцинома, так же, как и AIS, часто сочетается с присутствием SIL в характерном для SIL молодом возрасте (раньше, чем развивается плоскоклеточный РШМ) и не имеет симптомов.

Оценка прогноза заболевания осуществляется на основании данных о размере опухоли, стадии по FIGO и TNM, наличии инвазии лимфоваскулярного пространства и гистологическом подтипе. Состояние лимфатических узлов является наиболее важным прогностическим фактором [57, 58]. Развитие и прогрессия РШМ этиологически обусловлено двумя неразрывно связанными, взаимно определяющими аспектами – молекулярно-генетическим профилем опухоли и иммунным статусом пациентки [169]. В настоящее время доказана вирусная этиология РШМ. Типы вируса папилломы человека (ВПЧ) высокой степени риска обуславливают развитие РШМ практически в 100% случаев [11]. При этом иммунный статус служит основой, формирующей условия для персистенции ВПЧ и индукции развития РШМ [239].

Таблица 2 - Стадирование по FIGO, 2018 и TNM, 2017

Первичная опухоль (Т)		
TNM	FIGO	Хирургическо-патологические находки
Категории	Стадия	
TX		Невозможно оценить первичную опухоль
T0		Первичная опухоль не определяется
Tis		Рак in situ
T1	I	Опухоль ограничена шейкой матки
T1a	IA	Инвазивная карцинома, определяемая только при патоморфологическом исследовании; инвазия в строму < 5.0 мм от основания эпителия
T1a1	IA1	Инвазия в строму < 3.0 мм
T1a2	IA2	Инвазия ≥ 3.0 мм < 5.0 мм
T1b	IB	Инвазивная карцинома, глубина инвазии ≥ 5 мм, ограничена шейкой матки
T1b1	IB1	Опухоль глубиной ≥ 5 мм и шириной < 2 см в наибольшем измерении
T1b2	IB2	Опухоль от 2 до 4 см в наибольшем измерении
T1b3	IB3	Опухоль ≥ 4 см в наибольшем измерении
T2	II	Опухоль, распространяющаяся за тело матки, но не на нижнюю треть влагалища и не до стенки таза
T2a	IIA	Вовлечение верхних 2/3 влагалища без инвазии в параметрий
T2a1	IIA1	< 4 см в наибольшем измерении
T2a2	IIA2	≥ 4 см в наибольшем измерении
T2b	IIB	Инвазия параметрия, не доходящая до стенки таза
T3	III	Вовлечение нижней трети влагалища и/или распространение до стенки таза и/или гидронефроз и/или вовлечение тазовых и/или парааортальных лимфатических узлов
T3a	IIIA	Вовлечение нижней трети влагалища без распространения до стенки таза
T3b	IIIB	Распространение до стенки таза и/или гидронефроз
T3c	IIIC	Вовлечение тазовых и/или парааортальных лимфатических узлов
T3c1	IIIC1	Метастазы в тазовые л/у
T3c2	IIIC2	Метастазы в парааортальные л/у
T4	IV	Протяженность опухоли за пределы малого таза либо прорастание в слизистую оболочку мочевого пузыря/прямой кишки, доказанное биопсией
	IVA	Распространение на прилежащие органы
	IVB	Распространение в дистантные органы

Рак тела матки (РТМ) является одним из наиболее распространенных гинекологических видов рака. Более 90% случаев РТМ приходится на женщин

в менопаузе, а 25% - на пременопаузу. Однако 4% женщин с раком эндометрия моложе 40 лет, и более 70% из них при постановке диагноза не способны к деторождению. Большинство случаев рака эндометрия диагностируется на ранней стадии (80% на I стадии) [97]. Карцинома эндометрия была классифицирована на два основных клиничко-патологических и молекулярных типа: тип I и тип II.

Тип I является эндометриоидным типом и характеризуется генетической предрасположенностью (например, Синдром Линча-LS), он связан с ожирением, синдромом поликистозных яичников, гиперэстрогеновым состоянием, имеет благоприятный исход из-за минимальной инвазии миометрия. Рак II типа связан с более высоким возрастом пациента, высокой стадией и степенью, неэндометриоидными гистологическими исследованиями и плохим прогнозом. Он включает в себя несколько подтипов, таких как серозные, светлоклеточные и недифференцированные карциномы [235]. Стадирование РТМ проводят по классификациям TNM (8-е издание, 2017) и FIGO (2009) (*таблица 3*) [12].

В условиях персонализированной медицины важное значение может иметь оценка иммунного профиля опухоли. Терапевтические подходы противоопухолевой иммунотерапии основаны на стимуляции противоопухолевого иммунитета в результате воздействия на неспецифическое или адаптивное эффекторное звено иммунной системы [5].

Макрофаги, Нф, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты и естественные киллерные (НК) клетки могут играть роль либо в поддержке, либо в ограничении РЯ, РШМ, РТМ, в зависимости от сигналов [92, 179, 295, 327, 346].

Существует значительная взаимосвязь между хроническим воспалением и предрасположенностью к развитию опухоли при многих типах рака [369]. Воспаление также способствует развитию и прогрессированию РШМ, РЯ, РТМ [61, 84, 194].

Таблица 3 - Стадии PTM и карциносаркомы матки по системе TNM (8-й пересмотр, 2017) и классификации FIGO (2009)

TNM	FIGO	Описание
Tx		Невозможно оценить состояние первичной опухоли
T0		Первичная опухоль отсутствует
Tis		Рак in situ
T1a	IA	Опухоль в пределах эндометрия или опухоль с инвазией менее половины толщины миометрия
T1b	IB	Опухоль с инвазией более половины толщины миометрия
T2	II	Опухоль распространяется на строму шейки матки, но не выходит за пределы матки
T3a	IIIA	Прорастание серозной оболочки матки, поражение маточных труб или яичников (непосредственный переход опухоли или метастазы)
T3b	IIIB	Поражение влагалища или параметриев (непосредственный переход опухоли или метастазы)
T4	IVA	Прорастание слизистой оболочки мочевого пузыря или толстой кишки
NX		Оценить состояние регионарных лимфатических узлов невозможно
N0		Метастазов в регионарных лимфатических узлах (тазовых или парааортальных) нет
	IIIC	Метастазы в регионарных лимфатических узлах (тазовых или парааортальных)
N1	IIIC1	Метастазы в тазовых лимфатических узлах
N2	IIIC2	Метастазы в парааортальных лимфатических узлах
M0		Отдаленных метастазов нет
M1	IV	Отдаленные метастазы (в том числе метастазы в паховых лимфатических узлах и лимфатических узлах в пределах брюшной полости, кроме тазовых или парааортальных лимфатических узлов; за исключением метастазов во влагалище, придатках матки и по тазовой брюшине)

IL-1 β стимулирует увеличение продукции IL-6, IL-8, sICAM-1 и MCP-1, активирует сигнальные пути MAPK и NF-kB, таким образом увеличивая воспалительную реакцию [69, 219].

IL-1 обладает плеiotропным действием на воспаление на разных стадиях развития рака [372]. Антагонист рецептора IL-1 (IL-1Ra) связывает рецептор IL-1, ингибируя передачу сигналов IL-1 β и снижая уровни других цитокинов (IL-6 и TNF α) [51, 282]. IL-1RA уменьшает спонтанную продукцию факторов роста и пролиферацию лейкозных клеток [107]. IL-1RA действует как опухолевый супрессор, способствуя прогрессированию опухоли за счет

увеличения экспрессии VEGF-A в клеточной линии рака пищевода [175]. IL-18 - плеiotропный цитокин, продуцируемый лимфоидными и нелимфоидными клетками человека, в том числе и Нф, принадлежит к суперсемейству цитокинов IL-1, участвует в воспалительной реакции [116]. IL-18 продуцируется активированными макрофагами, эпителиальными клетками, остеобластами, кератиноцитами и, что наиболее важно, раковыми клетками и нейтрофилами [247, 267]. Опосредованная IL-18 передача сигналов действует как один из жизненно важных компонентов иммуномодулирующих цитокиновых сетей, участвующих в защите, воспалении и регенерации тканей [105]. IL-18 активирует сигнальные модули, митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) и фосфоинозитид-3-киназа/серин/треонинкиназа (PI3K/AKT), что приводит к продукции и высвобождению провоспалительных цитокинов [286]. IL-1 действует на разных уровнях в инициации и прогрессировании опухоли, включая управление хроническим воспалением, ангиогенез опухоли, активацию пути IL-17, индукцию миелоидных клеток-супрессоров и рекрутирование макрофагов, инвазию и метастазирование. IL-17A способен индуцировать продукцию ряда провоспалительных медиаторов, таких как IL-1, IL-6, TNF α , G-CSF и GM-CSF, эпителиальными, эндотелиальными и стромальными клетками, что способствует рекрутированию, активации и миграции Нф. IL-17-зависимый механизм, способствующий доставке Нф через эндотелий сосудов в лимфатические узлы во время острых воспалительных реакций [65].

Связь между воспалением и раком отражается в высоких уровнях IL-6 в микроокружении опухоли, где он способствует опухолевому генезу, регулируя сигнальные пути, включая апоптоз, выживание, пролиферацию, ангиогенез, инвазивность и метастазирование, метаболизм [205]. IL-6 являясь проопухолевым цитокином, способствует ангиогенезу и экспрессии VEGF посредством передачи сигналов JAK2/STAT3 [154, 189]. Повышение уровня циркулирующего IL-6 при раке других органов способствует увеличению местной и системной воспалительной реакции, включая ангиогенез, что влечет

за собой прогрессирующее опухоль и метастазирование [91]. IL-6 ингибирует апоптоз, индуцируя пролиферацию клеток и стимулируя ангиогенез при РЯ [294].

TNF α - проопухольный цитокин, участвует в эпителиально-мезенхимальном переходе, а также в развитии приобретенной лекарственной устойчивости, способствуя прогрессированию и метастазированию рака молочной железы [103]. Также TNF α модулирует течение РТМ [338]. TNF - ключевой активатор транскрипционного фактора NF-kB. NF-kB, в свою очередь, является ключевым эффектором TNF при раке, вызванном воспалением [344]. NE стимулирует активацию NF-kB и индукцию IL-8, IL-6, CSF [1, 251].

Интерфероны обладают сильными противоопухольными функциями, поскольку они ингибируют пролиферацию опухолевых клеток и способствуют апоптозу [272]. Jablonska et al. (2010) показали, что IFN имеет решающее значение для подавления экспрессии проангиогенных факторов, таких как VEGF и MMP-9. Способность незрелых популяций Нф человека высвобождать внеклеточные сети снижается после праймеризации интерфероном [330]. Исследование, проведенное на мышинной модели саркомы, показало, что опухолеассоциированные Нф (tumor-associated neutrophils (TAN)) реализуют противоопухольный потенциал путем секреции IFN γ *in vivo* [262]. Продуцируемые нейтрофилами IFN также играют ключевую роль в формировании противоопухольного иммунного ответа активируя Т-клетки, NK-клетки и макрофаги [285].

Воспалительные факторы, вызванные опухолью, стимулируют активацию Нф, которые, в свою очередь, поддерживают рост рака, ангиогенез и метастазирование РЯ, РШМ, РТМ [75, 263]. Нф также способны продуцировать IL-4, который связан с колониестимулирующим фактором 3 (CSF3) и играет важную роль в регуляции воспалительного ответа Нф [370]. Последние могут продуцировать IL-8, представляющий собой провоспалительный хемокин, известный своей ангиогенной активностью

[165]. Циркулирующие Нф пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой выделяют значительно больше MCP-1 по сравнению со здоровыми людьми [49]. NE, полученная из Нф, разрушает ангиогенные факторы [358], что приводит к генерации диффундирующих фрагментов VEGF, которые стимулируют рекрутирование воспалительных клеток [146].

За последнее десятилетие индекс NLR привлек значительный интерес как один из показателей оценки системного воспаления при различных типах рака, в том числе, РЯ, РШМ, РТМ [95, 319, 373]. Высокий NLR коррелирует с повышенной экспрессией IL-6, IL-8 при раке мочевого пузыря [99]. IL-2, IL-6 и IL-17 коррелировали с уровнем NLR, являясь потенциальными биомаркерами негативного прогноза при РЯ [187, 177, 271]. Однако остается актуальным вопрос о корреляционной связи циркулирующих цитокинов с NLR, роли Нф в воспалении и канцерогенезе опухолей женской репродуктивной системы.

1.4 – Характеристика нейтрофильных гранулоцитов на разных стадиях рака органов женской репродуктивной системы, специфика строения клетки, функционально-метаболических реакций, цитокинопродукции и цитокинорегуляции

Исследования на клинически значимых моделях рака показали, что Нф могут способствовать как росту и метастазированию опухоли, так и подавлять ее формирование. Для оценки фенотипа Нф используют несколько маркеров клеточной поверхности, что позволяет выделять циркулирующие и опухолевые Нф [315]. Поскольку при анализе источников, представленных в базах данных PubMed, Elsvier, РИНЦ не было обнаружено данных о взаимосвязи цитокинов и рецепторного статуса Нф при РЯ, РШМ, РТМ, представляют интерес результаты подобных исследований, выполненных авторами при других локализациях неоплазмы.

По последним данным [101, 264] установлено, что Нф участвуют в противоопухолевом иммунитете в качестве клеток эффекторов

антителозависимых цитотоксических реакций. Нф активно вовлекаются в реализацию полноценного противоопухолевого ответа [27]: участвуют в уничтожении мутировавших клеток и первыми из клеток иммунной системы мигрируют к опухоли на ранних стадиях ее формирования. Кроме того, показано, что Нф, являясь составной частью морфологической структуры опухолей, активны в иммунном надзоре против различных опухолевых клеток [6]. Также способность Нф убивать раковые клетки не зависит от высвобождения литических гранул или производства реактивных производных кислорода и не предполагает апоптотического механизма. В экспериментах показано, что Нф подавляют рост неоплазмы *in vivo*, осуществляя фагоцитоз опухолевых клеток и АЗКЦ [264].

Продолжительность жизни Нф изменяется при раке, и это связано с созреванием, продолжающимся от 7 часов в нормальных условиях до 17 часов при раке [59, 316]. Выживаемость клеток и провоспалительная активация регулируются NF- κ B [83]. При прогрессировании некоторых новообразований происходит дискоординация или исчезновение взаимосвязи уровня реструктуризации хроматина и реорганизации мембранной экспрессии рецепторов Нф [17]. Нарушение естественного характера реструктуризации ядерного хроматина Нф возникает на стадии синтеза активных компонентов гранулярного аппарата цитоплазмы Нф, что снижает цитотоксическую кислородзависимую противоопухолевую активность и приводит к неоднородной трансформации Нф при прогрессировании неопластического процесса [9, 25]. Внутриклеточные уровни АФК повышаются и провоспалительная активация NF- κ B ингибируется [375]. АФК могут оказывать как провоспалительное, так и противовоспалительное действие. В то время как низкие дозы H_2O_2 , по-видимому, вызывают активацию NF- κ B, высокий окислительный стресс не изменяет статус NF- κ B [162]. МПО отводится решающая роль в цитостазисе опухолевых клеток [14, 28], а угнетение реализации МПО коррелирует со снижением АЗКЦ Нф [274]. МПО участвует в петле отрицательной обратной связи подавления регуляции NF-

kB, чтобы ослабить провоспалительный цитокиновый ответ [243]. IL-17 может привлекать Нф, провоцируя продукцию нейтрофильных хемокинов, CXCL2 и CXCL3, в клетках плоскоклеточного рака пищевода и одновременно активировать Нф для экспрессии цитотоксических молекул, включая МПО, TRAIL и IFN γ , тем самым вызывая гибель раковых клеток [173]. Продуцируемый карциномой молочной железы IL-2 усиливает цитотоксичность Нф [108].

Во время реализации АЗКЦ Нф происходит значительная активация Нф: повышение хемотаксической активности, повышение экспрессии рецепторов CD11b/CD18, CD64, CD32, CD16, усиление процесса дегрануляции и экзоцитоза гранул, повышение активности кислородзависимых и кислороднезависимых систем, имеющих выраженный цитотоксический и цитолитический потенциал [115, 254]. TNF индуцирует реорганизацию цитоскелета в Нф и способствует модуляции активности β 2-интегрина на поверхности Нф, способствуя проявлению адгезивных свойств [336]. TIMP-1 влияют на гомеостаз Нф через передачу сигналов через CD63 [333]. Высокий системный TIMP-1 способствует рекрутированию Нф, которые участвуют в создании метастатических ниш в печени при колоректальном раке [335].

Выделенные от здоровых доноров Нф при контакте с опухолью способны подавлять ее через лиганд Fas/Fas. Но CD95 также вызывает неапоптотические сигналы, способствуя воспалению и канцерогенезу [209].

Нф могут продуцировать различные ангиогенные факторы или факторы роста [79, 104]. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) играет центральную роль в ангиогенезе опухоли и накапливается внутриклеточно в человеческих Нф [191]. При воздействии VEGF на рецепторы клеточной поверхности CD49d/CD29 Нф усиливается рекрутинг Нф в область гипоксии и усиливается выработка ими проангиогенных факторов [172]. Модулирует ангиогенез G-CSF за счет увеличения количества миеломоноцитарных клеток (VEGFR1 + Нф) и высвобождения ими VEGF в ишемическую ткань [274]. По данным Dalal V., et al. (2018) уровни IL-6 и VEGF-A были более высокие в асцитной

жидкости, чем в сыворотке, и они могут служить маркерами эпителиального рака яичника [60]. Показано, что продуцируемый опухолью IL-6 способствует повышению количества Нф в крови, и это связано с неблагоприятным прогнозом при раке легких, меланоме, колоректальном раке и раке почек [54, 210]. IL-6 также привлекает Нф в опухолевую ткань яичника [294]. По данным Du H. et al. (2016) при некератинизирующем плоскоклеточном РШМ ткань может продуцировать G-CSF. Ткань РШМ, которая выделяет G-CSF, имеет тенденцию к низкой дифференцировке, явной дисплазии, высокой степени злокачественности, обширному некрозу и инфильтрации гранулоцитарными клетками и часто ассоциируется с метастазами в лимфатические узлы, с низкой выживаемостью и плохим прогнозом [109].

Протеолиз внеклеточного матрикса с помощью MMP-9 вызывает высвобождение ангиогенных факторов и участвует в ангиогенезе опухоли [140]. IL-10 в опухолевых тканях совместно с VEGF и простагландином E2 стимулируют экспрессию m-CD95L эндотелиальными клетками. В присутствии MMP может высвободиться s-CD95L и тем самым запускается петля положительной обратной связи, ускоряющая канцерогенез [343]. Нф с высоким содержанием MMP-9 и отсутствием TIMP обладают высокой ангиогенной активностью [52].

Таким образом, синтезируемые Нф MMP, IL-10, по всей видимости, способствуют канцерогенезу.

В результате проведенных исследований Нестеровой И.В. с соавт. (2010) установлено, что при неопластических процессах пищеварительной системы имеют место дезорганизация и дезадаптация Нф, нарушение экстрацеллюлярной реализации цитотоксического и цитолитического потенциала Нф, что может сопровождаться как нарушением экстрацеллюлярной микробицидности, так и/или дефектной прямой и АЗКЦ. Ожидается, что подобные изменения могут регистрироваться и при других видах неопластических реакций.

При контакте с опухолевыми клетками Нф образуют сети из нитей ДНК, которые ограничивают их пролиферацию [10]. По полученным ранее данным установлено, что NETs способны захватывать циркулирующие раковые клетки и тем самым рассматриваются, как координаторы прогрессирования опухолей и метастазов [98, 256].

От экспрессии и функционирования мембранных рецепторов Нф зависит адекватность реализации иммунного ответа, в целом, и противоопухолевой активности Нф, в частности [26]. Селектинмедирированная (CD62L) адгезия клеток опухоли к Нф и эндотелиальным клеткам может регулировать их гематогенное распространение в микрососудистом русле [76]. Энзимная активность поверхностного мембранного CD10 регулирует активационный статус Нф, контролирует отвечаемость на множество воспалительных пептидов [225]. Описано, что на ранних стадиях рака желудка имеет место снижение отношения числа Нф к лимфоцитам, что сопровождается уменьшением экспрессии молекул CD10 и CD35 на Нф. За этим следуют снижение интенсивности "респираторного взрыва" и депрессия противоопухолевой активности Нф, что предопределяет прогноз при данной патологии [172]. Взаимодействие CD11b/CD18 и CAM-1 имеет фундаментальную роль в FcR-опосредованных механизмах нейтрофильного цитолиза опухолевых клеток [89, 115]. После контакта Нф с опухолевыми клетками происходит высвобождение кислородных метаболитов, ферментов, запускающих протеолиз опухолевых клеток [199]. Активация CD11b/CD18 приводит к значительному усилению экспрессии FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), CD40, CD80, CD86, HLA-DR. Функциональные возможности FcR в иммунном ответе связаны не только с распознаванием объектов фагоцитоза, но и с механизмами киллинга опухолевых клеток. Зарегистрирована мощная и очень быстрая (в течение 30 мин) цитотоксичность Нф к различным опухолям посредством взаимодействия с FcR *in vitro* и *in vivo* [124, 192]. Экспрессия CD16 снижена на поверхностной мембране апоптических Нф [234]. Описаны низкая экспрессия CD16 и низкий

уровень активности щелочной фосфатазы Нф у пациентов с хроническим миелолейкозом [195], что можно ожидать и при изучении неоплазм женской репродуктивной системы. На модели В-лимфомы (Raji-опухолевой клеточной линии) доказана необходимость наличия CD32 для индукции нейтрофильного цитолиза опухолевых клеток посредством запуска АЗКЦ [89]. В то же время имеются данные о том, что Нф у больных с карциномой желудочно-кишечного тракта проявляют дефектную АЗКЦ против Raji-опухолевой клеточной линии [342], что, возможно, связано с нарушением экспрессии CD32. Нф, экспрессирующие CD64, становятся преобладающими из всех цитостатических FcγR на Нф, и, как следствие, повышается цитотоксичность Нф против опухолевых клеток [192]. G-CSF является сильным хемоаттрактантом для Нф [147] и его уровень может быть увеличен при моделировании различных видов злокачественных опухолей [138, 174, 241]. Исследователями выявлено, что воздействие G-CSF у пациентов с неходжкинской лимфомой при нейтропениях, вызванных химиотерапией, повышает экспрессию CD64 на Нф, приводя к активации АЗКЦ и тем самым повышая противоопухолевые способности этих эффекторных клеток [254]. CD89 (FcαRI) выступает как мощная триггерная молекула на Нф, инициирующая лизис клеток опухоли [115]. Демонстрировалось, что FcαRI представляет самый мощный FcR на Нф для привлечения Нф при участии IL-8 в опухолевые колонии и инициации АЗКЦ с разнообразными опухолевыми антигенами [67, 114]. Важно также отметить, что незрелые Нф, мобилизованные из костного мозга после обработки G-CSF, вызывали лизис клеток опухоли через FcαRI, но при этом оказались неспособными к уничтожению клетки опухоли через FcγR [114]. Несмотря на то, что FcαRI является более эффективным по сравнению с FcγRI в проведении ранних сигналов и инициации эффекторных функций, одновременное присутствие FcγRI и FcαRI приводило к более выраженному лизису опухолевых клеток [178]. Аналогичных данных при опухолевых процессах женской репродуктивной системы в доступной литературе не найдено.

При анализе одномоментной экспрессии нескольких рецепторов на поверхностной мембране Нф при колоректальном раке выделили две субпопуляции Нф: мажорную субпопуляцию с фенотипом $CD64^-CD32^+CD16^+CD11b^+$ и минорную с фенотипом $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+$, которые отличались друг от друга как фенотипически, так и ответом на воздействие цитокинов ($IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF) в системе *in vitro* [23].

По результатам исследования Нестеровой И.В. с соавт. (2010), выявлено, что при колоректальном раке в циркуляции находится достоверно большее количество Нф, экспрессирующих $CD10^+$, $CD11b^+$, $CD16^+$ (но не $CD32^+$), чем у здоровых лиц. Однако, выявленный уровень плотности экспрессии $CD11b^+$, $CD16^+$ и $CD32^+$ на Нф недостаточен для адекватного проявления противоопухолевой АЗКЦ Нф при распространенных процессах колоректального рака. Повышенный уровень $IFN\gamma$ и GM-CSF на ранней стадии рака легкого человека, имеют важное значение для дифференциации $CD11b^+CD15^{hi}CD66b^+CD16^{int/low}CD10$ нейтрофильных предшественников в костном мозге в противоопухолевые Нф [278], а также $IFN\gamma$ влияет на активацию $CD16^+$ Нф [318].

В экспериментальных исследованиях показано, что Нф мышей проявляли хорошую противоопухолевую активность, в том числе и АЗКЦ, против клеток меланомы, экспрессировавших низкий уровень FasL. В то же время культивирование Нф с клетками меланомы, экспрессирующими высокий уровень FasL, вызвало нарушение противоопухолевой активности Нф за счет дефекта продукции реактивных форм кислорода, снижения экспрессии $CD11b$, уменьшения секреции желатиназы В и транскрипционного FasL [80, 88]. Одним из возможных объяснений некоторых из очевидных противоречий в оценке роли Нф в онкогенезе является связь с нарушением баланса между нейтрофильными медиаторами, что способствует прогрессии или ингибированию опухолевого роста. Зачастую имеющее место смещение в сторону опухолевого роста возникает вследствие превалирования негативных

стимулов в опухолевом микроокружении, что угнетает противоопухолевую активность Нф [181].

Нф проникают в ткани опухоли из кровеносных сосудов под воздействием специфических хемокинов, например, KC/CXCL-1 и MIP2 α /CXCL2, цитокинов (таких, как TNF α и IFN γ), при участии молекул клеточной адгезии, локализованных на их поверхности (CD11b), а также на поверхности эндотелиальных клеток (селектин, ICAM-1 и PECAM-1) [111], способствуя на поздних стадиях прогрессированному росту опухоли, ангиогенезу и метастазированию [327]. IL-2 дозозависимо стимулирует синтез белка и РНК в Нф, способствует прикреплению к эндотелиальным клеткам, что повышает их активность [357]. Также ростовые факторы (G-CSF и GM-CSF) [71, 149, 151, 331], цитокины и ферменты привлекают Нф в опухоль [98]. Цитокиновая модуляция внутриопухолевого рекрутирования Нф и их функций приводит к разрушению опухоли и противоопухолевой иммунной памяти [202]. Локальная продукция цитокинов клетками опухоли действует на эндотелий и опухолеассоциированные макрофаги (TAM), которые запускают цитокиновый и хемокиновый каскад, экспрессию эндотелиальных молекул адгезии, что приводит к рекрутированию и активации Нф [44, 117]. Продуцируемые клетками злокачественных опухолей IL-2, IL-4, TNF α , GM-CSF, G-CSF, IL-12, IL-15 и хемокин CCL16 (LCC) способны вызвать эффективную противоопухолевую активность Нф за счет повышения уровня синтеза и секреции ими цитотоксических медиаторов, цитостатических и ангиостатических факторов, различных хемотаксических молекул, которые привлекают к работе и активируют другие клетки иммунной системы, участвующие в противоопухолевой защите [202]. Повышение активности IL-4 ограничивал вызванное G-CSF распространение Нф и миграцию в ткани, влияя на передачу сигналов хемокинов CXCR2-CXCR4 в Нф [352]. IL-4 рекрутирует Нф через активацию цитокин-индуцированного хемоаттрактанта CINC-1 и молекул адгезии ICAM-1 [184]. IL-4 активирует перестройки цитоскелета Нф, синтез актина *de novo* в Нф и задерживает их апоптоз [144].

По данным Espinoza-Sánchez N.A. et al. (2017) высокий уровень MCP-1/CCL2 и G-CSF в культуре рака молочной железы способствует рекрутированию как моноцитов, так и Нф.

Сильным хемоаттрактантом, активирующим миграцию Нф в опухоль, является IL-8 (CXCL8), который воздействует на Нф через рецепторы CXCR1 и CXCR2 [117, 339]. Причем, есть данные, что сами опухолевые клетки содействуют привлечению Нф в локусы формирования опухоли, секретировав этот хемокин [47]. Через те же самые рецепторы Нф могут ответить на другие хемокины, такие как GRO $\alpha/\beta/\gamma$ (CXCL-1/2/3), ENA-78 (CXCL-5), GCP-2 (CXCL-6) и NAP-2 (CXCL-7) [339].

При раке груди, как сами опухолевые клетки могут секретировать высокий уровень GM-CSF, что способствует количественному приросту Нф и активации их функций, так и контактно взаимодействуя с Нф, клетки опухоли провоцируют в них выработку онкостатина М, который способствует опухолевой прогрессии и инвазивному росту опухоли [66, 276]. IFN γ в микроокружении опухоли продлевает время выживания Нф [46].

Экспериментальные исследования неопластического микроокружения продемонстрировали наличие в кровообращении двух субпопуляций Нф: 1) зрелые, малообъемные и высокоплотные клетки (т.е. Нф высокой плотности), проявляющие противоопухолевую активность (фенотип N1); и 2) гетерогенная популяция клеток большого объема и низкой плотности с фенотипом N2 (т.е. Нф низкой плотности), а также незрелые Нф, полученные из костного мозга, такие как клетки-супрессоры миелоидов (т.е. гранулоцитарные клетки) [355]. В физиологических условиях Нф высокой плотности составляют примерно 95% популяции. В опухолевой среде процент Нф низкой плотности быстро увеличивается, что потенциально делает их доминирующей фракцией в циркуляции [304]. Возможно, что N2 и N1 происходят из разных циркулирующих субпопуляций Нф, которые проявляют свои свойства уже в кровотоке [143]. Поэтому в настоящее время остается актуальной оценка

морфо-функционального состояния циркулирующих Нф при опухолях женской репродуктивной системы.

Представленные, согласно данным литературы, в *таблице 4* коктейли цитокинов функционируют как регуляторы между про- и противоопухолевыми фенотипами Нф. В соответствии с данными литературы (источники представлены в *таблице 5*) Нф могут быть разделены на про- и противоопухолевые популяции.

Таблица 4 – Цитокины, участвующие в поляризации нейтрофилов

N1	N2
IFN β [353]	G-CSF [242]
IL-2 [285]	IL-10 [242, 298]
IL-17 [173]	TGF β [242]
TNF [316]	IL-6 [96, 198, 276, 298]
IFN γ [316]	

Таким образом, рак развивается в организме, где цитокины, помимо участия в формировании пула иммунокомпетентных клеток, также служат потенциальными сигналами роста для раковых клеток. Динамика перекрестного обмена между иммунной системой и раковыми клетками, опосредованная цитокинами и хемокинами, изменяется во время инициации, роста и прогрессирования рака [200]. Присутствие медиаторов воспаления в микроокружении опухоли ингибирует или способствует развитию рака, через активацию или ингибирование Нф.

Нф являются гетерогенными иммунными клетками, которые, обладают фагоцитарными свойствами. Двойная роль Нф в инициации, развитии и прогрессировании опухоли обусловлена продукцией нейтрофилами факторов роста, хемокинов и цитокинов, АФК. Наличие кластеров в крови “Нф-циркулирующие опухолевые клетки” может способствовать метастазированию с высвобождением цитокинов, которые стимулируют деление опухолевых клеток. Нф N1- и N2-типов или Нф высокой и низкой плотности представляют собой иммуностимулирующую и

иммуносупрессивную подгруппы клеток при раке [355]. Внеклеточные ловушки Нф могут протектировать рост опухоли и метастазов, защищать опухолевые клетки от цитотоксических иммунных клеток, что приводит к нарушению клиренса опухоли [193]. С другой стороны, существуют данные о том, что сети могут ингибировать миграцию опухолевых клеток [118].

Таблица 5 – Параметры популяций про- и противоопухолевых циркулирующих нейтрофилов

параметр	Циркулирующие нейтрофилы		Данные литературы
	Противо-	Про-	
	опухолевые		
АФК	↑	↓	[242, 353]
TNF	↑	↓	[242, 353]
CD95	↑	↓	[242]
CD11b	↑	↓	[260]
CD16	↓	↑	[143]
CD63	↑	↓	[353]
MPO	↑	↓	[242]
ФЧ	↑	↓	[242]
TIMP-1	↑	↓	[251]
IFN (I типа)	↓	↑	[321]
IFN γ	↑	↓	[345]
IL-8	↓	↑	[242, 294]
MMP-9	↓	↑	[110, 251]
MMP-13	↓	↑	[180]
VEGF	↓	↑	[314]
IL-18	↓	↑	[316]
NE	↓	↑	[110]
NET	↓	↑	[374]
IL-17	↓	↑	[78, 347]
MCP-1	↓	↑	[291]
G-CSF	↓	↑	[250]
IL-1 β	↓	↑	[314]
NF-kB	↓	↑	[147, 287]
IL-6	↓	↑	[221]
Ригидность мембраны	↑	↓	[313]
IL-2	↑	↓	[140, 255]
IL-4	↑	↓	[197]

Примечание: ↑ - повышенный уровень по данным литературы,
↓ - сниженный уровень по данным литературы.

Поэтому функция Нф является спорной и требует тщательной переоценки при неопластических процессах, в том числе при злокачественных новообразованиях женской репродуктивной системы.

На основании всего вышеизложенного, важным является изучение и анализ влияния цитокинового профиля на изменение фенотипа циркулирующих нейтрофилов в динамике прогрессии злокачественных опухолей женской репродуктивной системы.

ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационная работа выполнена в ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (УлГУ): научные исследования проведены на кафедре физиологии и патофизиологии медицинского факультета им.Т.З.Биктимирова Института медицины экологии и физической культуры (ИМЭиФК УлГУ), в Научно-исследовательском медико-биологическом центре ИМЭиФК УлГУ, в лаборатории сканирующей зондовой микроскопии Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы УлГУ, клинический материал был получен из гинекологического отделения ГУЗ Ульяновский областной клинический онкологический диспансер (ОКОД) г.Ульяновска.

2.1 – Общая характеристика обследуемых

Отбор пациентов, которые находились на обследовании и лечении в гинекологическом отделении ГУЗ ОКОД г.Ульяновска (2011-2019 гг.), осуществлялся в соответствии с целью и задачами исследования, критериями включения и исключения, при условии информированного добровольного согласия. Критериями включения в экспериментальную группу были: впервые диагностированный рак яичников (РЯ) (I - IV стадии по FIGO) [13], рак шейки матки (РШМ) (I – IV стадии по FIGO) [58], рак тела матки (РТМ) (I - III стадии по FIGO) [12] до получения противоопухолевого лечения (*рисунок 1*), отсутствие сопутствующих острых заболеваний любой этиологии, а также хронических инфекционных заболеваний. Критерии исключения - гормонпродуцирующие опухоли яичников, аутоиммунные заболевания, диагностированный иммунодефицит. Исследование проведено согласно требованиям комиссии по этике Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (протокол № 1 от 15.01.2011). Расчет размера выборки осуществлялся при

помощи программы G*Power [122] для мощности исследования 80% и допустимого уровня ошибки первого рода 5%. Размер эффекта Коэна рассчитывался с помощью онлайн-калькулятора (<https://lbecker.uccs.edu>). Значения средних и стандартных отклонений исследуемых показателей для расчета размера эффекта были получены путем формирования пилотных подгрупп в экспериментальной и контрольной группах (число образцов=5 в каждой подгруппе).



Рисунок 1 – Алгоритм отбора пациентов, которые находились на обследовании и лечении в гинекологическом отделении ГУЗ ОКОД г.Ульяновска (2011-2019 гг.)

Примечание: ГУЗ ОКОД (Государственное учреждение здравоохранения Областной клинический онкологический диспансер), ЗНО - злокачественные новообразования, РЯ - рак яичников, РТМ - рак тела матки, РШМ - рак шейки матки, CIN - цервикальная интраэпителиальная неоплазия.

Для проведения исследований была взята периферическая кровь:

- впервые выявленных пациентов с опухолью яичников (n=152): из них: с ДОЯ (цистаденомы различного гистологического подтипа) (n=30), на ранних

(I-II) стадиях рака яичников (РЯ) (n=30), с распространенным процессом III (n=52) и IV стадий (n=40) по международной классификации FIGO (таблица 6).

Таблица 6 - Клинические характеристики пациенток с опухолями яичников, включенных в исследование

Группа	Клиническая характеристика	Значение
Доброкачественные опухоли яичников, n=30	Возраст - медиана (IQRQ1-Q3), лет	54 (49 - 59)
Рак яичников, n=122	Возраст - медиана (IQRQ1-Q3), лет	60 (53-65)
	Стадия по классификации FIGO	
	- I, n (%)	12 (9,8)
	- II, n (%)	18 (14,7)
	- III, n (%)	52 (42,6)
	- IV, n (%)	40 (32,8)
	Гистологический подтип	
	- серозный high-grade, n (%)	67 (54,9)
	- муцинозный, n (%)	12 (9,8)
	- эндометриоидный, n (%)	19 (15,6)
	- светлоклеточный, n (%)	10 (8,2)
- недифференцированный, n (%)	14 (11,5)	

Примечание: IQR - интерквартильный размах.

- впервые выявленных пациентов с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (CIN) (n=32), с раком шейки матки (РШМ): Ia стадия (начальный рак) (n=51); Ib – IIa стадии (местноограниченный рак) (n=37) и IIb – IV стадии (распространенный рак) (n=31) по международной классификации FIGO (таблица 7).

- впервые выявленных пациентов с миомой матки (n=20) и РТМ, которые были разделены на стадии I (нераспространенный РТМ) (n=84), и II-III (распространенный РТМ) (n=32) по международной классификации FIGO (таблица 8).

Контрольную группу составили 22 соматически здоровые женщины. Медиана возраста женщин и IQR контрольной группы составили 52 (29 - 65) года.

Таблица 7 – Характеристика пациенток с онкопатологией шейки матки, включенных в исследование

Группа	Клиническая характеристика	Значение
CIN, n=32	Возраст - медиана (IQRQ1-Q3), лет	47 (27 - 67)
	Стадии по классификации FIGO	
	- I, n (%)	2 (6,2)
	- II, n (%)	11 (34,4)
	- III, n (%)	19 (59,4)
Рак шейки матки, n=119	Возраст - медиана (IQRQ1-Q3), лет	46 (29 - 60)
	Стадия по классификации FIGO	
	- Ia, n (%)	51 (42,9)
	- Ib, n (%)	17 (14,3)
	- IIa, n (%)	20 (16,8)
	- IIb, n (%)	21 (17,6)
	-IV, n (%)	10 (8,4)
	Гистологический подтип	
	плоскоклеточный ороговевающий	45 (37,8)
	плоскоклеточный неороговевающий	62 (52,1)
аденокарцинома	12 (10,1)	

Примечание: IQR - интерквартильный размах.

Таблица 8 – Характеристика пациенток с патологией тела матки, включенных в исследование

Группа	Клиническая характеристика	Значение
Миома матки, n=20	Возраст - медиана (IQRQ1-Q3), лет	49 (41 - 59)
Рак тела матки, n=116	Возраст - медиана (IQRQ1-Q3), лет	60 (57 - 64)
	Стадия по классификации FIGO	
	- I, n (%)	84 (72,4)
	- II, n (%)	20 (17,2)
	- III, n (%)	12 (10,4)
	Дифференцировка эндометриоидной опухоли	
	высокая	64 (55,2)
	низкая	31 (26,7)
	умеренная	13 (11,2)
	недифференцированная	8 (6,9)

Примечание: IQR - интерквартильный размах.

2.2 – Лабораторные исследования периферической крови

Схема научного исследования представлена на рисунке 2.

Общеклиническое исследование крови проводилось на гематологическом анализаторе Mindray BC 3600 (Mindray, Китай) в ГУЗ Областной клинической онкологической диспансер. Измеряли число клеток в относительных (%) и абсолютных значениях (*10⁹/л).

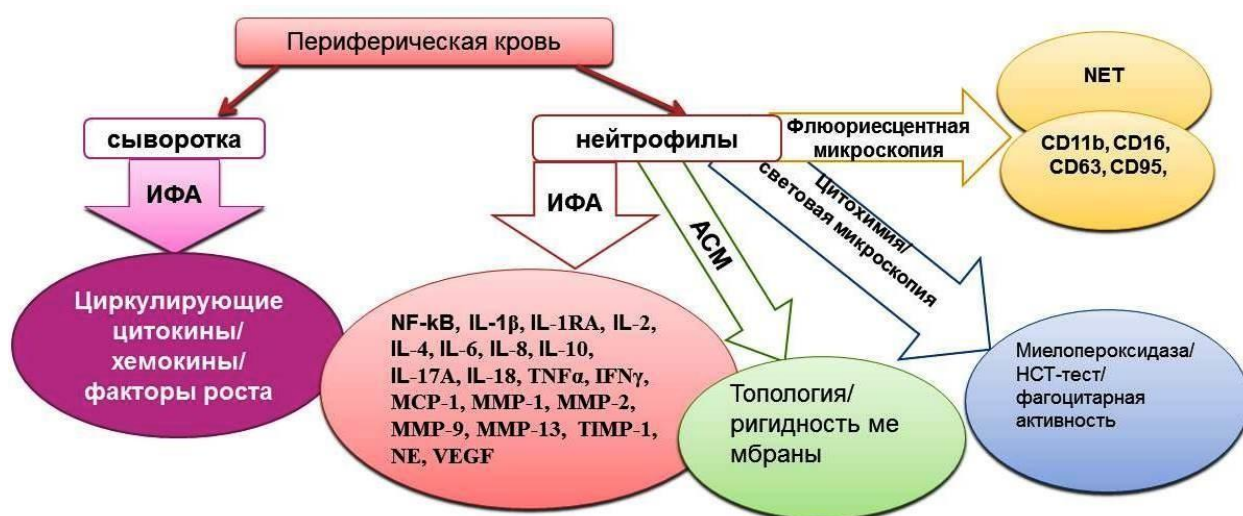


Рисунок 2 – Программа научного исследования

Примечание: АСМ - атомно-силовая микроскопия, ИФА - иммуноферментный анализ, НСТ-тест (тест с нитросиним тетразолием), IFN – интерферон, IL – интерлейкин, MCP - моноцитарный хемотаксический протеин MMP - матриксная металлопротеиназа, NF-kB - ядерный фактор-каппаВ, NE - нейтрофильная эластаза, NET - внеклеточные нейтрофильные ловушки, TIMP - тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы, TNF – фактор некроза опухоли, VEGF - васкулоэндотелиальный фактор роста.

Клинический материал был получен из гинекологического отделения ГУЗ ОКОД г.Ульяновска.

Сыворотку крови у пациентов после постановки диагноза до начала противоопухолевого лечения получали стандартным способом путем центрифугирования в течение 15 минут, скорости вращения 1500 об/мин при температуре +4°C. Сыворотку хранили при температуре -20°C не более 6 месяцев и размораживали однократно для выполнения иммуноферментного анализа.

Для приготовления лизата Нф, клетки выделяли из 5 мл гепаринизированной крови в двойном градиенте плотности фиколлюрографина ($\rho=1.117$ и 1.077 г/мл) по методу Долгушина И.И. с соавт. (2011). Взвесь Нф трижды отмывали физиологическим раствором. Чистота фракции Нф составляла 96—98%. Жизнеспособность Нф в тесте с 0.5%-ным трипановым синим составляла 95%. Выделенные и отмытые Нф помещали в 0,15 мл физиологического раствора (по 50 ± 5 тыс. клеток) и получали лизаты путем пятикратного повторения замораживания (-70°C) и оттаивания ($+37^{\circ}\text{C}$) 10-15 мин.

2.3 – Цитохимические методы исследования

Для проведения цитохимических методов исследования были приготовлены мазки крови и использована световая микроскопия.

2.3.1 – Определение параметров внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов в спонтанном и индуцированном тесте с нитросиним тетразолием (НСТ-тесте)

В качестве индукторов «респираторного взрыва» использовали неопсонизированный и опсонизированный зимозан ("Sigma", США), подготовленный по методу Тепляковой О.В. с соавт. (2011). Приготовление мазков для определения спонтанного и индуцированного НСТ-теста осуществлялось по методу Нестеровой И.В. с соавт. (2008).

2.3.2 – Метод определения активности миелопероксидазы в нейтрофилах

Активность миелопероксидазы нейтрофилов определялась в мазках по методу Грехема-Кнолля (Graham-Knoll) с бензидином. Результаты оценки уровня МПО выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК) [18].

2.3.3 – Метод определения фагоцитарной активности клеток

Применялась методика изучения фагоцитарной активности Нф, основанная на количественном определении поглотительной и переваривающей способности Нф по отношению к *Sacharomyces cervisiae* [18]. Рассчитывались фагоцитарный индекс (ФИ) – процент нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе от общего их количества (%), определение фагоцитарного числа (ФЧ) – среднего числа дрожжевых клеток, поглощенных одним нейтрофилом (у.е.). Для оценки переваривающей функции нейтрофилов использовали индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ): ИЗФ больше 1,0, указывал на завершенность фагоцитоза, ИЗФ менее 1,0 свидетельствовал о снижении фагоцитарной активности Нф.

2.4 – Методы флуорисцентной микроскопии в оценке рецепторного аппарата нейтрофилов и внеклеточных нейтрофильных ловушек

Пользуясь данным методом использовали флуоресцентный микроскоп (NikonNi-U, Япония). Окрашенные клетки изучались под покровным стеклом и масляной иммерсией (PanReac Applichem) при увеличении 100x15.

2.4.1 – Иммунофенотипирование нейтрофилов

В 96-луночный круглодонный планшет к выделенным Нф добавляли одно из моноклональных антител: CD11b, CD16, CD64, CD95 (ООО «Сорбент», Москва), с последующим добавлением подготовленного флуорофора FITC, согласно методике производителя реагентов. Количество антиген позитивных клеток определяли, как долю флуоресцирующих клеток при подсчете 100 Нф.

2.4.2 – Оценка внеклеточных нейтрофильных ловушек

Для исследования формирования внеклеточных нейтрофильных ловушек (Neutrophil Extracellular Traps (NETs)) применяли способ Долгушина И.И., Андреевой Ю.С. (Патент РФ № 2384844, 2010), который заключался в использовании раствора акридинового оранжевого для окраски ядерного вещества фиксированных Нф и активированных различными

микроорганизмами. Для активации были использованы клетки *Sacharomyces cervisiae*. Учет проводили с помощью флуоресцентного микроскопа (Nikon Ni-U, Япония), используя фильтры с длиной волны не более 490 нм, и эмиссию с длиной волны 520 нм. Ядра нейтрофилов окрашивались в ярко-зеленый цвет, цитоплазма гранулоцитов не окрашивалась, нейтрофильные ловушки были представлены тонкими ярко-зелеными нитями, занимающими пространство, в 2-3 раза превосходящее диаметр неизмененного нейтрофила, а бактериоактиваторы имели ярко-оранжевый цвет. Нф делились на группы: клетки с сегментированным ядром, клетки с недифференцированным ядром, свободнолежащие ярко-зеленые волокна, представляющие собой нити ДНК Нф.

В работе производили расчет числа нейтрофильных ловушек (НЛ): количества нейтрофильных ловушек, содержащих бактериальные клетки из 100 подсчитанных сетеподобных структур (%); и индекс нейтрофильных ловушек (ИЛ) - число бактерий в 100 подсчитанных ловушках в пересчете на 1 структуру (усл.ед.).

2.5 – Метод атомно-силовой микроскопии в определении ригидности и топологии мембраны нейтрофилов

Нативные Нф в чашке Петри с физиологическим раствором сканировали в водной среде, используя микроскоп SolverPro (NT-MDT, Зеленоград). Использовали зонды с жесткостью 0,3 N/m, радиус закругления кончика зонда составлял 10 nm. Фиксированные препараты (способ сканирования в воздушной фазе) и живые клетки, находящиеся в растворе Хенкса (сканирование в водной фазе) исследовались как в контактном, так и в полуконтактном режимах. Контактный метод заключается в том, что кантилевер непосредственно касается поверхности и повторяет её форму по мере прохождения поверхности. Кантилевер жестко связывается с отдельным пьезоэлементом и колеблется со своей резонансной частотой. В полуконтактном режиме кантилевер как бы постукивает по поверхности и

характеризуются дополнительным условием сканирования, которое позволяет осуществить более щадящее и более тонкое сканирование поверхности.

Для оценки ригидности мембран использовали режим спектроскопии. Ригидность мембран оценивалась по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца [290].

2.6 – Метод иммуноферментного анализа для изучения уровня внутри- и внеклеточной концентрации цитокинов

Определение уровня цитокинов в сыворотке крови и лизате нейтрофилов выполняли стандартным иммуноферментным «сэндвич» методом с использованием наборов: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IFN γ , TNF α , G-CSF, MCP-1, VEGF-A (ЗАО «Вектор-Бест-Волга», Н.Новгород), IL-1RA (ООО «Цитокин», С.-Пб.) [297]. Также измеряли уровень матриксных металлопротеиназ с использованием тест-систем: Human MMP-1 (Abfrontier, Quantikine ELISA Kits), Human MMP-2 и -9 Quantikine ELISA Kits (RandD Systems, США), Human MMP-13 Quantikine ELISA Kits (RayBiotech), для оценки тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы - HumanTIMP-1 Quantikine ELISA Kits, для определения нейтрофильной эластазы (PMN-Elastase, Quantikine ELISA Kits) (eBioscience (Bender MedSystems, Австрия) (ЗАО «БиоХимМак»). Уровень NF- κ B оценивали с использованием наборов NF- κ Bp65 (общий) (eBioscience, USA) методом иммуноферментного анализа. Ядерные экстракты для определения содержания NF- κ B готовили в соответствии с инструкцией изготовителя реагентов.

Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм и референсной - 620 нм, Концентрация цитокинов и факторов роста в образцах определялась путем построения стандартной кривой по серии приготовленных для каждого набора стандартов.

2.7 – Статистические методы обработки полученных данных

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа.

Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводился с использованием программ STATISTICA 13 (TIBCO, USA) и Jamovi 1.6.5.0.

В результате статистической обработки выявлены отличия лабораторных данных пациентов с доброкачественными опухолями и предраковыми состояниями по сравнению с контрольной группой, а также полученных на разных стадиях прогрессирования опухолей женской репродуктивной системы с аналогичными данными в контрольной группе, при доброкачественных опухолях или при предраковых состояниях, так как одна из задач исследования - поиск критериев для ранней диагностики любого из патологических состояний.

В случае описания количественных показателей, имеющих нормальное распределение, полученные данные объединялись в вариационные ряды, в которых проводился расчет средних арифметических величин (M) и ошибки стандартных отклонений (m), границ 95% доверительного интервала (95% ДИ).

Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывались при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q1-Q3$). Для сравнения независимых совокупностей в случаях отсутствия признаков нормального распределения данных использовался U -критерий Манна-Уитни. Статистическая значимость различий количественных показателей, имеющих нормальное распределение, между группами оценивалась при помощи однофакторного дисперсионного анализа путем расчета критерия F Фишера (ANOVA). С целью изучения связи между явлениями, представленными количественными данными, распределение которых отличалось от нормального, использовался непараметрический метод – расчет коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Значения коэффициента корреляции (r) интерпретировались в соответствии со шкалой Чеддока: менее 0,1 - связь отсутствует, 0,1-0,3 –

слабая связь, 0,3-0,5 – умеренная связь, 0,5-0,7 – заметная связь, 0,7-0,9 – высокая связь, 0,9-0,99 - очень высокая связь.

Прогностическая модель, характеризующая зависимость количественной переменной от факторов, также представленных количественными показателями, разрабатывалась с помощью метода парной или множественной линейной регрессии. В качестве показателя тесноты связи использовался линейный коэффициент корреляции F . Для оценки качества подбора линейной функции рассчитывался квадрат линейного коэффициента корреляции R^2 , называемый коэффициентом детерминации.

Построение прогностической модели риска исхода злокачественного новообразования выполнялось при помощи метода бинарной логистической регрессии. Статистическая значимость полученной модели определялась с помощью критерия χ^2 .

Для оценки диагностической значимости количественных признаков при прогнозировании определенного исхода, в том числе вероятности наступления исхода, рассчитанной с помощью регрессионной модели, применялся метод анализа ROC-кривых. С его помощью устанавливалось оптимальное разделяющее значение количественного признака, позволяющее классифицировать пациентов по степени риска исхода, обладающее наилучшим сочетанием чувствительности (Sens.) и специфичности (Spec.). Качество прогностической модели, полученной данным методом, оценивалось исходя из значений площади под ROC-кривой со стандартной ошибкой и отношением шансов (ОШ), 95% доверительным интервалом (ДИ) и уровня статистической значимости.

ГЛАВА 3 – СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ И НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАКА ЯИЧНИКОВ

Используя цитохимические, иммуноферментные методы исследования, атомно-силовую и флюоресцентную микроскопию было оценено количественно-функциональное состояние Нф при доброкачественных опухолях яичников (ДОЯ) и на разных стадиях рака яичников (РЯ).

3.1 – Оценка нейтрофильно-лимфоцитарного отношения, ригидности мембраны и экспрессии дифференцировочных антигенов нейтрофилов периферической крови пациентов с раком яичников

В результате проведенных исследований периферической крови пациентов с доброкачественными опухолями и раком яичников установлено повышение абсолютного количества лейкоцитов (Le) и значимое повышение NLR в группе с ДОЯ ($8,80 \pm 1,79 \times 10^9/\text{л}$ против $6,54 \pm 0,21 \times 10^9/\text{л}$, $p=0,0140$, $4,34 \pm 1,05$ против $2,22 \pm 0,07$ в контроле, $p=0,0201$, соответственно) (рисунок 3).

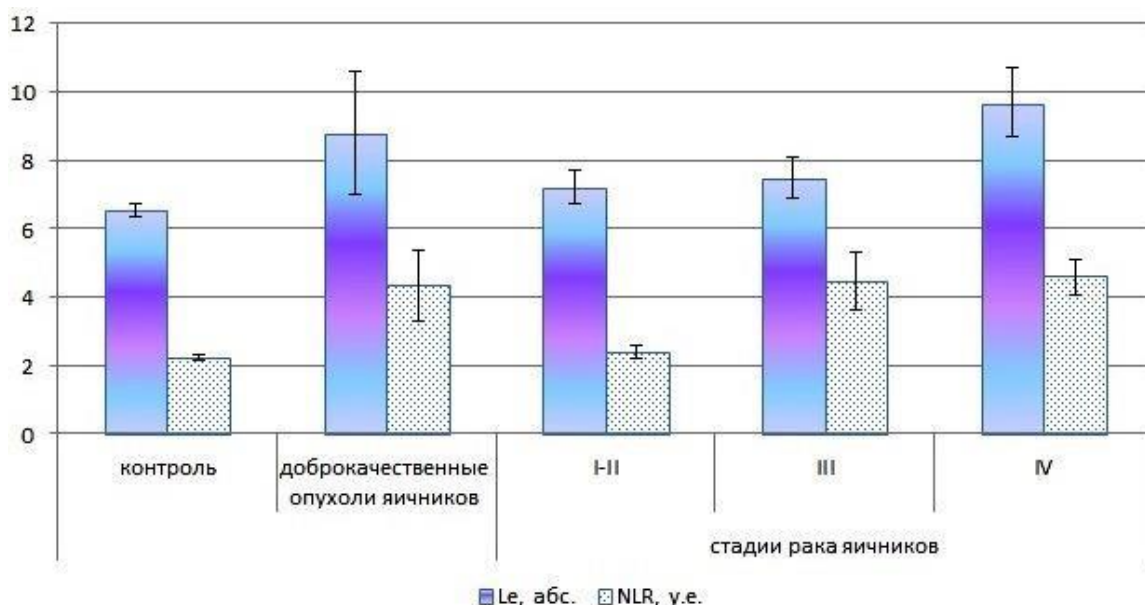


Рисунок 3 - Общее количество лейкоцитов и NLR у больных с доброкачественными опухолями и на различных стадиях рака яичников
 Примечание: Le - лейкоциты, NLR - нейтрофильно-лимфоцитарное отношение.

На начальных стадиях РЯ наблюдалась тенденция к снижению количества Le ($p=0,1785$), однако, NLR снижалось почти в 2 раза по сравнению с таковым в группе с ДОЯ ($2,38\pm 0,20$ против $4,34\pm 1,05$, $p=0,0527$). На III стадии РЯ количество Le статистически значимо не изменялось ($p=0,7332$), однако, NLR повышалось ($4,47\pm 0,87$ против $2,38\pm 0,20$ на I-II стадии РЯ, $p=0,0545$). На IV стадии РЯ при неизменном NLR ($p=0,9081$) увеличивалось количество Le ($9,70\pm 1,01 \times 10^9/\text{л}$ против $7,50\pm 0,61$ на III стадии РЯ, $p=0,0598$) (рисунк 3).

Оценка фенотипического разнообразия клеток периферической крови показала следующее. Повышение количества CD63⁺Нф наблюдалось на III стадии РЯ по сравнению с группой контроля, и снижение на I-II стадии по сравнению с аналогичными данными в группе с ДОЯ (таблица 9).

Таблица 9 – Количество нейтрофилов с различным фенотипом при доброкачественных опухолях яичников и на различных стадиях рака яичников (M±m)

Группа Показатель	Контроль n=22	ДОЯ, n=15	Стадии рака яичников		
			I-II, n=17	III, n=26	IV, n=20
CD11b ⁺ , %	60,40±7,76	95,60±3,92	98,80±0,53	92,00±3,49	93,00±1,00
p		p ₁ =0,0077	p ₁ =0,0069	p ₁ =0,0218	p ₁ =0,0069
CD16 ⁺ , %	98,90±0,74	99,60±0,40	99,00±0,44	94,80±1,76	94,00±6,00
p				p ₁ =0,0279	p ₁ =0,0284 p ₂ =0,0117
CD63 ⁺ , %	34,90±7,38	52,00±12,66	40,44±1,26	60,22±11,26	52,80±4,88
p				p ₁ =0,0328 p ₃ =0,0454	
CD95 ⁺ , %	38,54±6,18	31,60±10,42	20,00±0,52	68,80±12,36	60,36±3,62
p			p ₁ =0,0208	p ₁ =0,0409 p ₂ =0,0125 p ₃ =0,0164	p ₂ =0,0409

Примечание: p₁- данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественных опухолях яичников (ДОЯ); p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

Помимо этого, при оценке фенотипа Нф циркулирующей крови было обнаружено увеличение количества CD11b⁺Нф, способных к повышенной

адгезии при ДОЯ и на всех стадиях РЯ по сравнению с контрольной группой. При прогрессировании РЯ количество $CD11b^+$ Нф статистически значимо не изменялось по сравнению с аналогичным в группе с ДОЯ. Количество $CD16^+$ Нф при ДОЯ и на начальных стадиях РЯ находилось в пределах коридора нормы. А на III и IV стадиях РЯ значимо снижалось.

Для оценки количества Нф, способных к апоптозу, определяли экспрессию CD95. В процессе исследования было установлено, что число клеток с таким фенотипом снижалось на I-II стадия РЯ по сравнению с количеством $CD95^+$ Нф в группе контроля, а на III и IV стадиях РЯ - увеличивалось по сравнению с аналогичными показателями с ДОЯ (таблица 9).

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) была осуществлена оценка архитектоники Нф, а также модуля упругости (модуля Юнга) клеточной мембраны Нф в жидкой среде. Фиксация клеток позволила улучшить полученное изображение. Нф доноров имели округлую форму, с достаточно равномерно распределенными цитоплазматическими гранулами, они распластывались по поверхности подложки (рисунок 4).

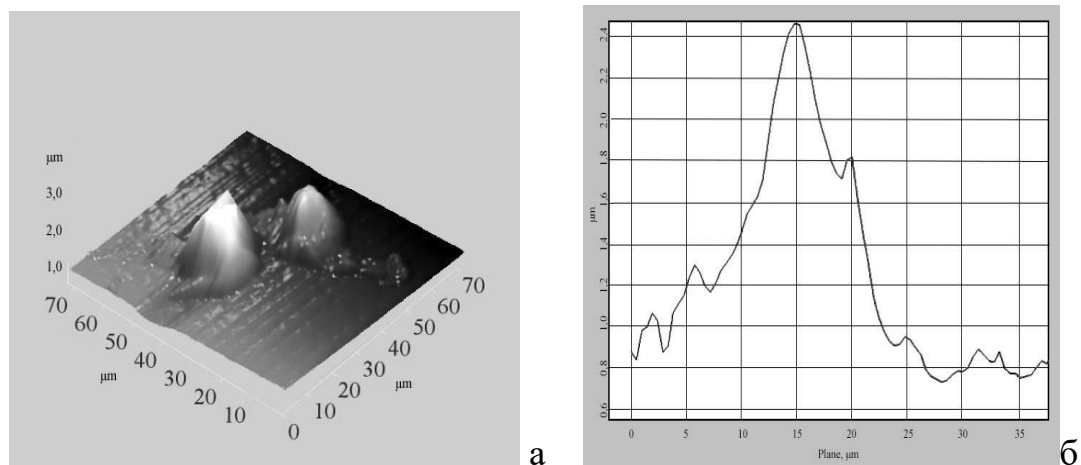


Рисунок 4 – Нейтрофил обследуемого из контрольной группы после сканирования в жидкой среде (а), боковое сечение его профиля (б).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что границы клетки были четко видны, хорошо визуализировалось полиморфное сегментированное ядро и гранулы цитоплазмы, которые выявлялись в боковом

сечении (рисунк 4). На III стадии РЯ Нф приобретали округлую форму, клетки не распластывались по подложке, практически вся цитоплазма концентрировалась возле ядра было затруднительно дифференцировать гранулы цитоплазмы (рисунк 5).

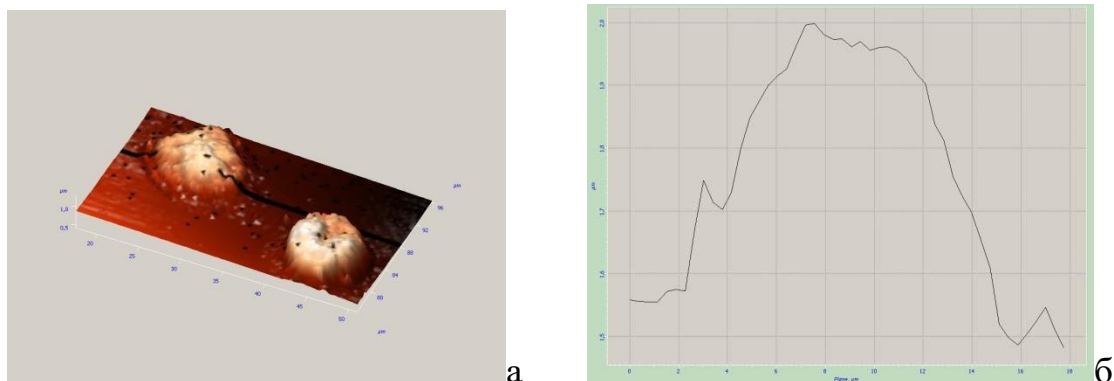


Рисунок 5 – Нейтрофилы пациентки с раком яичников III стадии при фиксации метанолом [результат сканирования в 3D (а), боковое сечение профиля клетки (б)]

Нф больных РЯ терминальной стадии приобретали овальную форму, выраженные границы ядра, увеличенную зернистость цитоплазмы (рисунк 6).

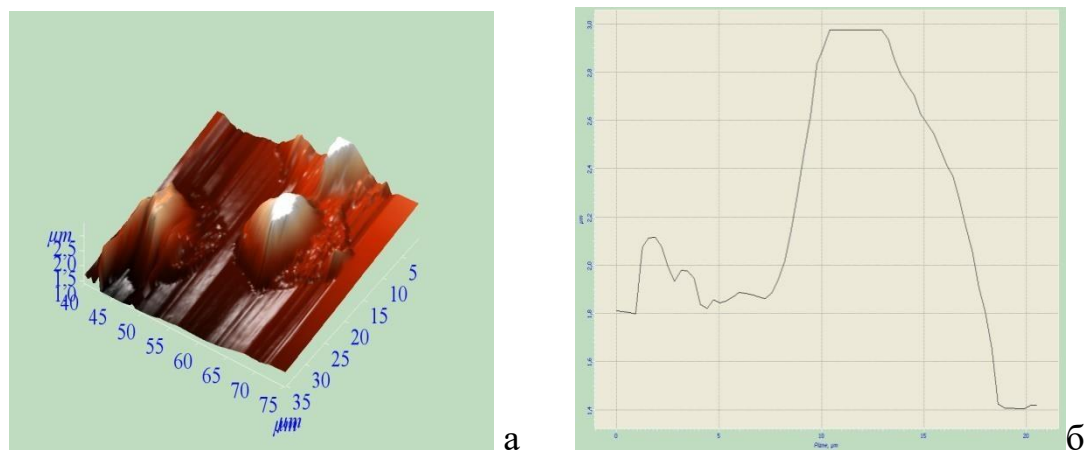


Рисунок 6 – Нейтрофил пациентки с раком яичников IV стадии при фиксации метанолом (результат сканирования в 3D (а), боковое сечение профиля клетки (б))

Было установлено значимое увеличение ригидности мембраны Нф при прогрессировании РЯ ($61,2 \pm 2,5$ МПа при ДОЯ, $67,3 \pm 2,6$ МПа на I-II стадии, и $71,9 \pm 2,7$ МПа у пациентов с IV-ой клинической стадией РЯ против $56,7 \pm 2,4$ МПа в контроле ($p_{\text{доя}}=0,0001$, $p_{\text{I-II}}=0,0096$, $p_{\text{IV}}=0,0005$)). При этом у пациентов

с III стадией РЯ ригидность мембраны была выше, чем в контроле и чем при ДОЯ ($87,8 \pm 2,8$ МПа, $p_1=0,0001$ и $p_2=0,0001$).

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать изменение рецепторного аппарата, архитектоники и возрастание ригидности мембраны Нф у пациентов с ДОЯ и на всех стадиях РЯ. Количество циркулирующих Нф, имеющих активированный фенотип ($CD11b^+$, $CD63^+$) при прогрессировании РЯ повышается, количество $CD16^+$ Нф на терминальных стадиях РЯ – понижается.

3.2 – Показатели кислородзависимого киллинга нейтрофилов периферической крови при доброкачественных опухолях и раке яичников

В результате проведенного исследования при ДОЯ по сравнению с контрольной группой выявлено статистически значимое повышение активности Нф в индуцированном НСТ-тесте и продукции МПО (рисунк 7). На начальной стадии РЯ наблюдалось статистически значимое в сравнении с контрольной группой снижение ФИ и, ИЗФ был менее 1 (таблица 10).

Таблица 10 – Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников (M±m)

Группы Показатели	Контроль, n=22	ДОЯ, n=15	Стадии рака яичников		
			I-II, n=17	III, n=26	IV, n=20
ФИ, %	41,20±6,44	40,86±11,88	22,29±1,59*	57,33±8,81* [°]	49,33±6,96
ФЧ, у.е.	1,97±0,17	1,98±0,33	2,33±0,09	2,42±0,29	2,04±0,43
ИЗФ, у.е.	1,04±0,14	1,01±0,18	0,81±0,02	1,15±0,33	0,96±0,17

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; [°] - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ); ° - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии ($p \leq 0,05$), ИЗФ - индекс завершенности фагоцитоза, ФИ - фагоцитарный индекс, ФЧ - фагоцитарное число.

Однако способность Нф продуцировать АФК в НСТ-тесте статистически значимо повышалась и активность МПО не изменялась по сравнению с аналогичными показателями в группе с ДОЯ (рисунк 7).

На III стадии РЯ заметно повышался ФИ по сравнению с аналогичным показателем в группе контроля и с ДОЯ (таблица 10), но при этом снижалась активность Нф в спонтанном НСТ-тесте, а также уровень МПО по сравнению с начальной стадией РЯ (рисунок 7). На IV стадии РЯ в Нф снижалась способность продуцировать МПО и АФК в различных модификациях НСТ-теста по сравнению с аналогичными данными в группе с ДОЯ (рисунок 7).

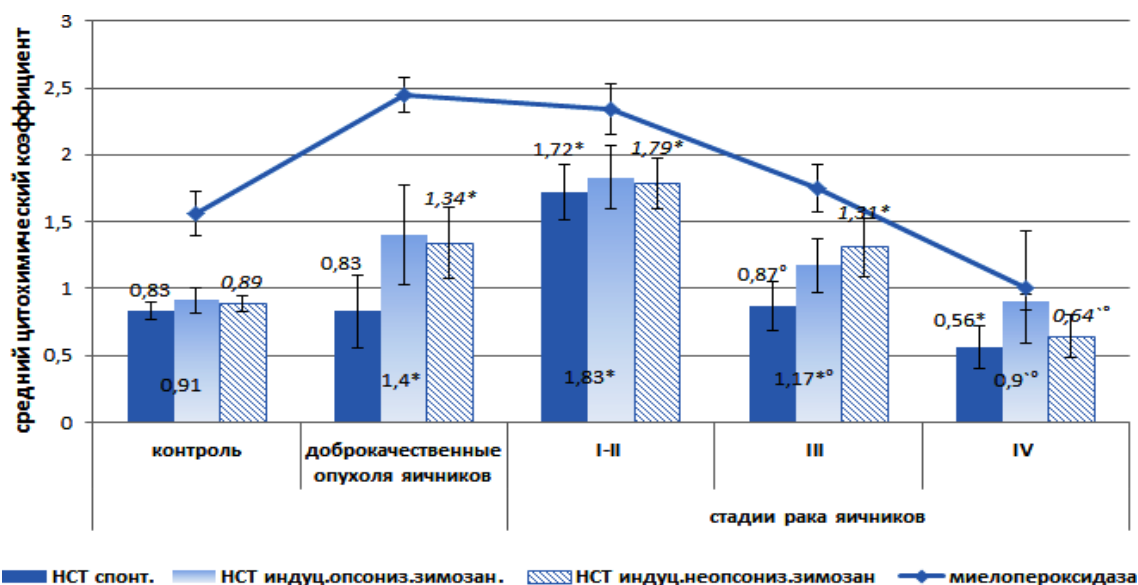


Рисунок 7 – Активность миелопероксидазы и показатели НСТ-теста нейтрофилов при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; ` - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников; ° - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии ($p \leq 0,05$)

Таким образом, в Нф крови при ДОЯ преобладает миелопероксидазная цитотоксичность, на начальной стадии РЯ на фоне сниженной фагоцитарной активности возрастает продукция АФК. Прогрессирование РЯ сопровождается снижением продукции АФК и МПО.

3.3 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки при доброкачественных опухолях и раке яичников

Нами было установлено, что на начальной стадии РЯ ЧЛ Нф по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы и при ДОЯ

увеличивалось в 17,1 и 16,3 раза соответственно, при этом ИЛ резко снижался ($0,32 \pm 0,04$ у.е. против $1,50 \pm 0,29$ у.е. ($p=0,0032$) и $1,50 \pm 0,29$ у.е. ($p=0,0007$) соответственно) (рисунк 8).

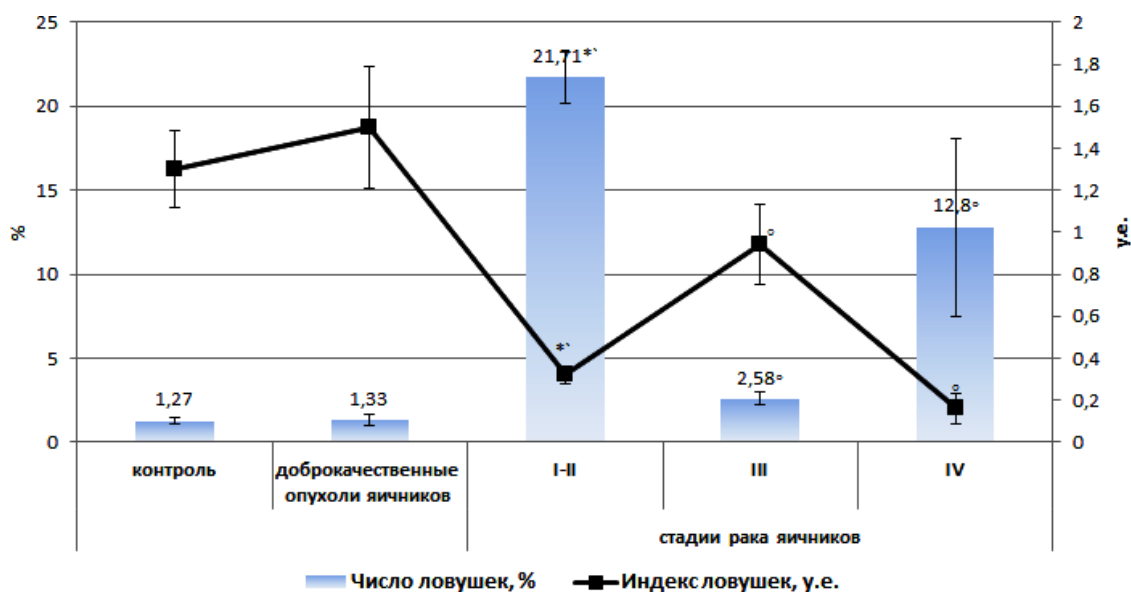


Рисунок 8 – Показатели образования NET при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; ` - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников; ° - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии ($p \leq 0,05$).

На III стадии РЯ ЧЛ Нф снижалось по сравнению с аналогичными показателями на I-II стадии РЯ ($2,58 \pm 0,39$ % против $21,71 \pm 1,54$ %, $p=0,0001$), а ИЛ повышался ($0,94 \pm 0,20$ у.е. против $0,32 \pm 0,04$ у.е., $p=0,0169$), но не достигал аналогичного уровня при ДОЯ и в контрольной группе. На IV стадии РЯ ЧЛ увеличивалось до $12,8 \pm 5,31$ % по сравнению с аналогичными показателями на III стадии РЯ ($p=0,0512$), однако значимо снижался ИЛ до $0,16 \pm 0,07$ ($p=0,0043$) (рисунк 8).

Таким образом, ДОЯ сопровождаются увеличением способности Нф к захвату клеток с помощью NETs. Начальные стадии РЯ так же связаны с ростом ЧЛ, однако, ИЛ резко снижается. При прогрессировании РЯ способность Нф образовывать NETs увеличивается, но количество захваченных клеток становится минимальным.

3.4 – Уровень про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, NF- κ B, нейтрофильной эластазы, васкулоэндотелиального фактора, матриксных металлопротеиназ в лизате нейтрофилов при доброкачественных опухолях и раке яичников

В результате проведенных нами исследований выявлено значимое снижение уровня IL-1 β в лизате Нф при РЯ по сравнению с аналогичными показателями в группе контроля и в сравнении с ДОЯ (*таблица 7*). Концентрация IL-1RA в лизате Нф резко и значимо снижалась у пациентов с ДОЯ и затем снова повышалась на начальной стадии РЯ, продолжая нарастать при прогрессировании РЯ (*таблица 7*). Разнонаправленная динамика уровней IL-1RA и IL-1 β в Нф, вероятно, свидетельствовала о блокировании провоспалительного IL-1 β при РЯ, со снижением проопухолевой активности Нф.

Изучение полученных данных также показало, что в группе с ДОЯ имелась тенденция к снижению уровня IL-17A в сравнении с контрольной группой. На начальной стадии и при прогрессировании РЯ наблюдалось снижение IL-17A относительно в группы контроля и ДОЯ, что также может служить подтверждением снижения проопухолевой активности Нф (*таблица 11*).

Повышение уровня G-CSF в лизате Нф при ДОЯ и на всех стадиях РЯ, связывается нами с трансформацией Нф в процессе прогрессирования патологических изменений яичников (*таблица 11*). Существенное снижение уровня IL-18 в лизате Нф при ДОЯ, и повышение при прогрессировании РЯ уровня IL-18 в лизате Нф, возможно, является необходимым для активации сигнальных молекул в Нф (*таблица 11*).

Таблица 11 – Уровень цитокинов семейства IL-1, IL-17A, G-CSF в лизате циркулирующих нейтрофилов при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	ДОЯ, n=15	Стадии рака яичников		
				I-II, n=15	III, n=26	IV, n=20
IL-1 β	Me (Q1- Q3)	8,941 (3,764- 15,659)	6,445 (4,522- 12,578)	4,498 (2,273-6,361)	3,545 (1,949- 4,410)	2,826 (1,634- 4,410)
	p			p ₁ =0,0099 p ₂ =0,0375	p ₁ =0,0097 p ₂ =0,0326	p ₁ =0,0076 p ₂ =0,0293
IL-1RA	Me (Q1- Q3)	1681,276 (892,491- 2983,449)	68,445 (43,987- 87,704)	521,363 (154,876- 1145,325)	1682,381 (773,713- 2997,581)	1896,030 (631,475- 3000,000)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0597 p ₂ =0,0051	p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0439	p ₂ =0,0001
IL-17A	Me (Q1- Q3)	45,296 (39,776- 54,765)	25,785 (12,554- 35,389)	15,586 (10,728- 23,571)	15,789 (11,786- 26,581)	13,689 (12,697- 14,924)
	p			p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0022 p ₃ =0,0314
IL-18	Me (Q1- Q3)	37,345 (18,492- 55,863)	5,293 (3,354- 7,258)	6,636 (4,916-8,674)	8,235 (5,892- 22,082)	20,384 (10,720- 29,957)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0002	p ₁ =0,0045 p ₂ =0,0354 p ₃ =0,0371	p ₁ =0,0302 p ₂ =0,0010
G-CSF	Me (Q1- Q3)	0,125 (0,057- 0,141)	0,374 (0,326- 0,394)	0,373 (0,223-0,471)	0,394 (0,331- 0,463)	0,276 (0,271- 0,289)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0005

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ); p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

Обращает на себя внимание факт повышения уровня G-CSF в лизате на фоне снижения его концентрации в сыворотке крови при ДОЯ и на всех

стадиях РЯ. Разрастающаяся при этом популяция Нф, оцениваемая по общему количеству клеток и NLR, может косвенно свидетельствовать об усилении онкогенной функции циркулирующих Нф. В результате проведенного нами исследования выявлено значимое повышение уровня IL-6 в лизате Нф при ДОЯ и на ранних стадиях РЯ, что может свидетельствовать об усилении проангиогенных функций Нф. При прогрессировании РЯ продукция IL-6 Нф снижалась до уровня контрольной группы (*таблица 12*).

Таблица 12 – Провоспалительные цитокины в лизате циркулирующих нейтрофилов при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	ДОЯ, n=15	Стадии рака яичников		
				I-II, n=15	III, n=26	IV, n=20
IL-2	Me (Q1- Q3)	3,907 (3,423-4,359)	5,855 (5,136- 6,342)	8,032 (6,475- 9,253)	11,486 (8,492- 30,096)	48,454 (20,299- 79,812)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0274	p ₁ =0,0078 p ₂ =0,0403 p ₃ =0,0401	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001
IL-6	Me (Q1- Q3)	1,329 (0,992-1,993)	12,613 (10,136- 14,193)	14,632 (12,301- 15,973)	1,212 (0,976- 2,688)	0,844 (0,581- 1,093)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001	p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0250 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0445
TNFα	Me (Q1- Q3)	2,370 (1,128-3,163)	2,182 (1,283- 3,705)	1,305 (1,139- 1,499)	0,957 (0,122- 2,380)	2,516 (0,434- 6,970)
	p			p ₁ =0,0019 p ₂ =0,0025		

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ); p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

Наблюдалось повышение уровня IL-2 в Нф как при ДОЯ, так и при прогрессировании РЯ. Было отмечено снижение уровня TNFα в лизате Нф на

начальной стадии РЯ и повышение при распространенном РЯ; значимое увеличение уровня IL-4 в лизате Нф при ДОЯ и при прогрессировании РЯ по сравнению с аналогичным уровнем в группе контроля (*таблица 12*), что, вероятно, играет важную роль в регуляции воспалительного ответа Нф при прогрессировании РЯ.

Установлено, что ДОЯ сопровождаются значимым снижением уровня IL-10 в лизате Нф (*таблица 13*).

Таблица 13 – Уровень противовоспалительных цитокинов в лизате циркулирующих нейтрофилов при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников

Группа		Контроль, n=22	ДОЯ, n=15	Стадии рака яичников		
				I-II, n=15	III, n=26	IV, n=20
Показатель (пг/мл)						
IL-4	Me (Q1- Q3)	1,457 (0,591- 2,069)	4,935 (2,537- 6,052)	2,024 (1,115- 5,932)	6,129 (3,956- 7,807)	2,589 (1,333- 4,773)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0014	p ₁ =0,0001 p ₃ =0,0053	p ₁ =0,0011 p ₂ =0,0353 p ₃ =0,0003
IL-10	Me (Q1- Q3)	63,961 (48,981- 88,843)	8,576 (4,995- 13,568)	10,380 (5,529- 25,680)	3,919 (1,921- 27,748)	9,983 (3,633- 73,981)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001		p ₁ =0,0027 p ₂ =0,0275
IFN γ	Me (Q1- Q3)	2,517 (1,661- 3,664)	6,625 (4,525- 8,702)	4,002 (2,587- 4,554)	0,870 (0,619- 1,186)	3,891 (2,771- 4,980)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0137 p ₂ =0,0002	p ₁ =0,0006 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0046 p ₂ =0,0009 p ₃ =0,0001

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ); p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

При прогрессировании РЯ уровень IL-10 в лизате Нф повышался по сравнению с группой ДОЯ, но был ниже, чем в группе контроля (*таблица 13*).

Уровень $IFN\gamma$ в лизате Нф увеличивался в группе с ДОЯ и снижался на III стадии РЯ (таблица 13). Концентрация IL-10, значимо сниженная в лизате Нф уже при ДОЯ, не восстанавливалась до уровня цитокина контрольной группы при РЯ. Также уровень $IFN\gamma$, значимо повышенный при ДОЯ и на I-II стадии РЯ, резко и понижался на III-IV стадии РЯ. Подобная динамика этих цитокинов может свидетельствовать о формировании проопухолевого фенотипа Нф при прогрессировании РЯ.

Не исключено, что статистически значимое повышение IL-8 в лизате Нф (таблица 14), связано с проангиогенными свойствами Нф при распространенном РЯ.

Таблица 14 – Уровень хемокинов в лизате нейтрофилов при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников

Группа		Контроль, n=22	ДОЯ, n=15	Стадии рака яичников		
				I-II, n=15	III, n=26	IV, n=20
Показатель (пг/мл)						
IL-8	Me (Q1- Q3)	158,826 (140,048- 186,034)	40,274 (36,543- 51,067)	26,463 (19,148- 27,935)	141,971 (46,105- 196,134)	227,566 (159,905- 319,372)
	p		$p_1=0,0001$	$p_1=0,0001$ $p_2=0,0001$	$p_2=0,0004$ $p_3=0,0001$	$p_1=0,0233$ $p_2=0,0233$ $p_3=0,0087$
MCP-1	Me (Q1- Q3)	17,217 (14,029- 19,561)	29,280 (24,984- 34,405)	22,518 (18,625- 25,741)	25,081 (19,249- 34,576)	29,614 (27,547- 31,912)
	p		$p_1=0,0001$	$p_1=0,0341$ $p_2=0,0035$	$p_1=0,0009$	$p_1=0,0001$

Примечание: p_1 - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p_2 - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ); p_3 - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

Уровень внутриклеточного MCP-1 повышался при ДОЯ, был несколько снижен на начальной стадии РЯ и вновь возрастал при прогрессировании РЯ (таблица 14). Возможно, что возросшая активность MCP-1 позволяла блокировать $IFN\gamma$ в Нф при распространенном РЯ.

В результате проведенного нами исследования выявлено статистически значимое снижение экспрессии NF-κB в ядерной фракции Нф при ДОЯ. На начальных стадиях РЯ экспрессия NF-κB в Нф повышалась относительно контрольной группы и группы с ДОЯ (таблица 15).

Таблица 15 – Уровень ядерного фактора-κB, васкулоэндотелиального фактора и нейтрофильной эластазы в лизате нейтрофилов крови при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников

Группа Показатель		Контроль, n=22	ДОЯ, n=30	Стадии рака яичников		
				I-II, n=15	III, n=26	IV, n=20
NF-κB, мг/мл	Me (Q1-Q3)	0,174 (0,125-0,201)	0,073 (0,071-0,076)	0,582 (0,465-0,683)	0,247 (0,118-0,394)	0,249 (0,170-0,380)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0088 p ₂ =0,0003 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0002 p ₂ =0,0001
VEGF, пг/мл	Me (Q1-Q3)	48,940 (40,989-52,851)	462,996 (289,546-571,924)	283,712 (211,971-489,324)	182,161 (96,998-267,275)	132,273 (108,180-148,937)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0003 p ₃ =0,0059	p ₁ =0,0002 p ₂ =0,0001
NE, нг/мл	Me (Q1-Q3)	0,361 (0,264-0,412)	0,594 (0,547-0,984)	0,025 (0,017-0,031)	1,025 (0,613-3,017)	4,129 (2,831-7,165)
	p		p ₁ =0,0023	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0322

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ); p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

На III и IV стадиях РЯ экспрессия NF-κB снижалась вдвое в сравнении с начальной стадией роста опухоли, однако оставалось статистически значимо выше аналогичных показателей при ДОЯ (таблица 15). Повышение NF-κB как основного регулятора активности провоспалительных цитокинов может свидетельствовать об усилении проопухолевой активности Нф.

Уровень VEGF в лизате Нф при ДОЯ в 9 раз выше, чем контрольной группе. На I-II стадиях РЯ уровень VEGF в лизате Нф не отличался от такового в группе с ДОЯ, а при прогрессировании РЯ его уровень снижался, однако, оставался выше, чем в группе контроля (*таблица 15*). Это может быть связано с тем, что VEGF является основным регулятором ангиогенеза, и повышение его концентрации уже при ДОЯ способствует формированию проопухолевого фенотипа Нф.

Исследование показало, что уровень внутриклеточного NE повышался при ДОЯ и значимо снижался на начальных стадиях РЯ. При прогрессировании опухолевого процесса уровень NE в лизате Нф был выше на стадии распространенного РЯ относительно группы с ДОЯ (*таблица 15*), что, вероятно, связано с участием NE в NF-κB-сигналинге.

При ДОЯ пул MMP-1 ($p=0,0421$), MMP-2 ($p=0,0032$) и TIMP-1 ($p=0,0834$) в нейтрофильных гранулоцитах увеличивался, а MMP-13 ($p=0,0012$) и MMP-9 ($p=0,0219$) - снижался по сравнению с данными в контрольной группе. При РЯ в лизате Нф отмечалось повышение концентрации MMP-1 ($p=0,0038$), MMP-13 ($p=0,0417$) и TIMP-1 ($p=0,0492$), но уровень MMP-2 ($p=0,0338$), MMP-9 ($p=0,0027$) понижался в сравнении с аналогичными показателями при ДОЯ (*рисунок 9*). Вероятно, повышенный синтез MMPs в Нф при ДОЯ и РЯ, создают условия для облегчения миграции опухолевых клеток через базальную мембрану и внеклеточный матрикс.

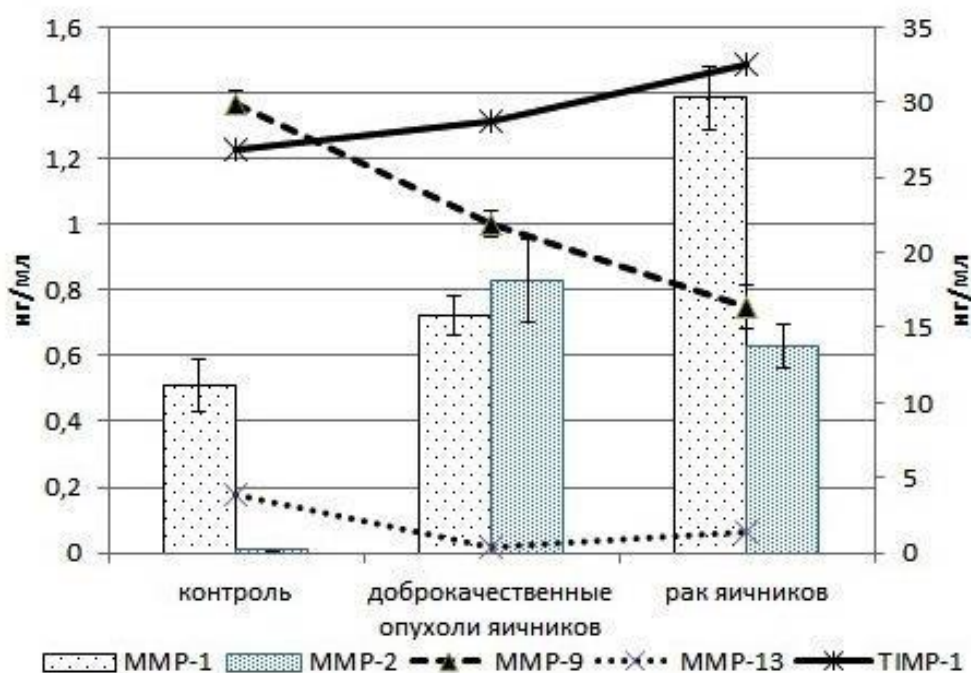


Рисунок 9 - Уровень матричных металлопротеиназ и тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы в нейтрофилах при доброкачественных опухолях и раке яичников

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; ` - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников ($p \leq 0,05$), MMP - матричная металлопротеиназа, TIMP - тканевый ингибитор матричных металлопротеиназ

На основании вышеизложенного можно полагать, что уже при ДОЯ интрацеллюлярно регистрируются значимые изменения цитокинового спектра, которые могут свидетельствовать о формировании проопухолевого фенотипа Нф, а именно: повышенные уровни G-CSF, IL-6, MCP-1, VEGF, NE, MMP-1, MMP-2 при ДОЯ, увеличение экспрессии NF-kB, IL-6 на начальной стадии РЯ и IL-18, TNF- α , IL-8, MCP-1, NE - при прогрессировании РЯ.

3.5 – Уровень цитокинов, васкулоэндотелиального фактора, нейтрофильной эластазы и матричных металлопротеиназ в сыворотке крови при доброкачественных опухолях и раке яичников

Уровень IL-1 β в сыворотке крови при прогрессировании РЯ статистически значимо не изменялся. Концентрация циркулирующего IL-1RA при ДОЯ повышалась в 4 раза в сравнении с уровнем, установленным в

контрольной группе и снижалась при прогрессировании РЯ (*таблица 16*). Такая динамика IL-1RA в сыворотке, вероятно, способствовала блокированию системного воспаления при ДОЯ. Уровень IL-2 в сыворотке увеличивался в 10 раз на начальной и терминальной стадиях РЯ в сравнении с данными контрольной группы исследования и с ДОЯ, что, возможно, позволяет говорить о снижении рекрутинга Нф при опухолеассоциированном воспалении; III стадия РЯ сопровождалась снижением уровня IL-2 в сыворотке крови до значений группы контроля и ДОЯ (*таблица 16*). Концентрация IL-6 в сыворотке крови больных с ДОЯ была ниже, чем в контрольной группе, вместе с тем, при прогрессировании РЯ уровень циркулирующего IL-6 возрастал в сравнении с данным, полученными при ДОЯ и статистически значимо не изменялся по сравнению с лабораторными показателями группы контроля (*таблица 16*), что, возможно, свидетельствовало об усилении воспаления на терминальной стадии РЯ.

Увеличение более чем на 15 % концентрации L-17A в сыворотке крови женщин с ДОЯ и на IV стадии РЯ в сравнении с лабораторными показателями в группе контроля, вероятно, может свидетельствовать об усилении провоспалительных эффектов данного цитокина и приводит к активации Нф периферической крови (*таблица 16*). Изучение и анализ показали, что концентрация IL-18 в сыворотке крови была повышена у пациентов с III стадией РЯ на 30% как в сравнении с данными в группе доноров, так и по сравнению со значениями пациентов с ДОЯ (*таблица 16*). Это обстоятельство дает возможность полагать, что наблюдался факт наличия вовлечения иммунокомпетентных клеток в развитие изучаемого патологического процесса.

Проведенный анализ лабораторных данных позволил установить, что уровень TNF α в сыворотке крови был снижен на III стадии РЯ в сравнении с данными, полученными у пациентов с ДОЯ (*таблица 16*).

Таблица 16 – Уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови при доброкачественных опухолях яичников и раке яичников

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	ДОЯ, n=15	Стадии рака яичников		
				I-II, n=15	III, n=26	IV, n=20
IL-1 β	Me (Q1- Q3)	1,811 (1,582- 2,182)	1,264 (0,858- 1,697)	2,290 (2,112- 2,498)	2,724 (2,244- 3,610)	2,461 (2,318- 2,606)
	p		p ₁ =0,0007	p ₁ =0,0003 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0011 p ₂ =0,0002 p ₃ =0,0361	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001
IL-1RA	Me (Q1- Q3)	200,209 (179,882- 266,188)	886,354 (235,765- 1121,432)	622,684 (366,921- 819,970)	529,525 (274,624- 889,547)	457,532 (258,164- 669,366)
	p		p ₁ =0,0011	p ₁ =0,0005	p ₁ =0,0004	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0321 p ₃ =0,0525
IL-2	Me (Q1- Q3)	2,531 (1,524- 3,015)	2,683 (1,345- 3,469)	20,963 (17,228- 26,847)	2,014 (0,958- 3,634)	20,937 (1,905- 35,985)
	p			p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0020 p ₂ =0,0108 p ₃ =0,0059
IL-6	Me (Q1- Q3)	16,883 (2,189- 31,550)	13,527 (13,154- 14,025)	14,615 (12,430- 17,338)	12,167 (5,468- 33,333)	17,860 (11,896- 26,524)
	p					p ₂ =0,0240
IL-17A	Me (Q1- Q3)	41,479 (39,484- 47,297)	63,533 (47,034- 70,436)	42,598 (32,440- 52,796)	40,879 (37,419- 62,111)	55,989 (42,961- 71,380)
	p		p ₁ =0,0102	p ₂ =0,0042		p ₁ =0,0173
IL-18	Me (Q1- Q3)	299,901 (152,369- 379,252)	255,765 (212,712- 332,127)	246,762 (168,850- 258,099)	388,606 (268,737- 464,900)	306,574 (213,215- 432,920)
	p				p ₂ =0,0283 p ₃ =0,0057	
TNF α	Me (Q1- Q3)	1,431 (0,971- 5,924)	2,507 (1,637- 2,905)	1,760 (1,380- 2,532)	1,467 (1,085- 2,057)	1,926 (1,755- 2,191)
	p				p ₂ =0,0262	p ₁ =0,0484
G-CSF	Me (Q1- Q3)	52,215 (45,987- 55,941)	0,903 (0,782- 0,983)	0,591 (0,321- 0,749)	11,75 (6,994- 17,963)	20,260 (10,628- 40,984)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0085	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0004 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0174

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ); p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

В то же время, концентрация G-CSF снижалась в сыворотке женщин с ДОЯ, однако на III и IV стадиях РЯ уровень фактора возрастал при ДОЯ, но был значимо ниже такового в группе контроля (*таблица 16*). Последнее может быть связано с некоторым увеличением количества циркулирующих Нф на терминальных стадиях РЯ.

Согласно полученным данным, уровень IL-4 и IL-10 в сыворотке крови больных повышался при ДОЯ и продолжал возрастать при прогрессировании РЯ. Концентрация IFN γ статистически значимо возрастала в 2 и 4 раза при исследовании сыворотки больных на III и IV стадиях РЯ, соответственно (*таблица 17*).

Таблица 17 – Уровень противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	ДОЯ, n=15	Стадии рака яичников		
				I-II, n=15	III, n=26	IV, n=20
IL-4	Me (Q1- Q3)	1,249 (0,434- 1,998)	1,596 (1,249- 2,196)	2,444 (1,936- 7,532)	2,651 (1,851- 8,280)	3,389 (1,698- 7,538)
	p		p ₁ =0,024 6	p ₁ =0,0007 p ₂ =0,0039	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0045	p ₁ =0,0002 p ₂ =0,0020
IL-10	Me (Q1- Q3)	1,476 (1,275- 1,841)	4,519 (3,916- 7,072)	4,159 (2,924- 5,923)	8,017 (2,382- 15,477)	13,242 (7,588- 16,224)
	p		p ₁ =0,000 1	p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0006 p ₃ =0,0245	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0015
IFN γ	Me (Q1- Q3)	4,156 (2,087- 5,747)	3,964 (3,548- 4,362)	4,287 (3,115- 5,028)	8,478 (7,121- 11,363)	16,847 (3,569- 27,293)
	p				p ₁ =0,0002 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0002	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0004 p ₃ =0,0066

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ); p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

Можно предполагать, что продуцируемые иммунокомпетентными клетками противовоспалительные цитокины создают условия для ингибирования пролиферации опухолевых клеток, способствуя их апоптозу.

Усиливающие воспалительную реакцию и рекрутирование Нф IL-8, а также MCP-1 значительно увеличивались в периферической крови при ДОЯ, концентрация их оставалась повышенной на всех стадиях РЯ в сравнении с данными в контрольной группе (таблица 18).

Также при изучении периферической крови больных с ДОЯ было установлено, что факторы VEGF и NE были увеличены вдвое в сравнении с донорами крови, и не изменялись на начальной стадии РЯ. На III стадии РЯ циркулирующий VEGF увеличивался при незначимом изменении NE в сравнении с данными, зарегистрированными у больных с ДОЯ. На IV стадии РЯ уровень VEGF в сыворотке крови изменялся не существенно, вместе с тем, в сравнении с предыдущей стадией повышался уровень NE (рисунок 10).

Таблица 18 – Уровень хемокинов в сыворотке крови при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников

Группа		Контроль, n=22	ДОЯ, n=15	Стадии рака яичников		
				I-II, n=15	III, n=26	IV, n=20
Показатель (пг/мл)						
IL-8	Me (Q1- Q3)	11,042 (10,300- 14,986)	67,694 (36,662- 98,398)	26,216 (19,344- 39,249)	24,156 (18,680- 26,264)	82,848 (31,927- 129,167)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0002 p ₂ =0,0107	p ₁ =0,0004 p ₂ =0,0003	p ₁ =0,0001 p ₃ =0,0001
MCP-1	Me (Q1- Q3)	270,098 (220,1479- 310,852)	513,091 (300,330- 645,621)	350,220 (263,954- 570,149)	448,544 (297,026- 597,014)	479,106 (294,931- 642,683)
	p		p ₁ =0,0002	p ₁ =0,0310	p ₁ =0,0012	p ₁ =0,0005

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ); p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

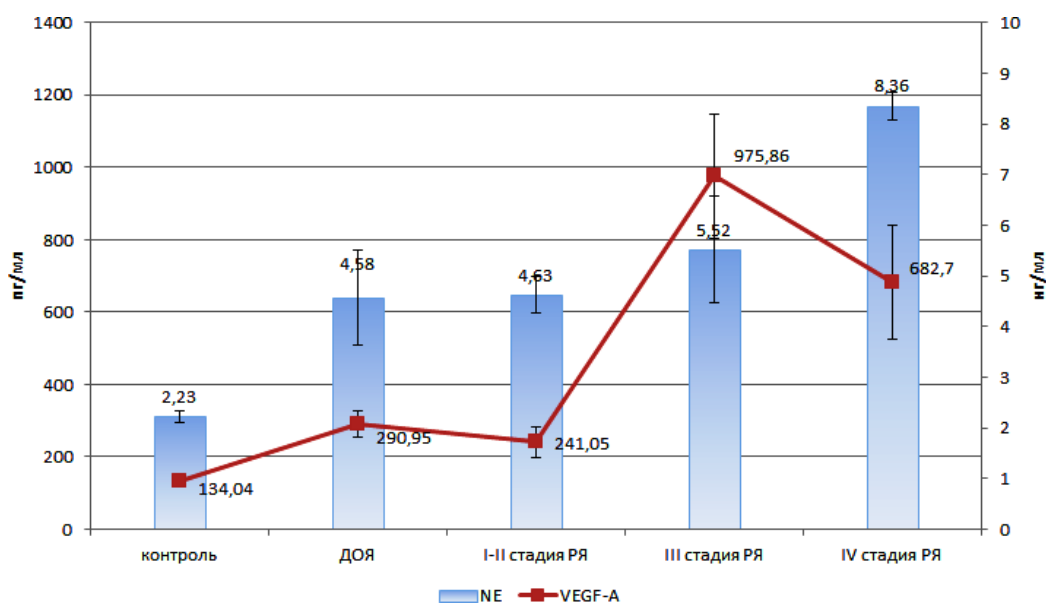


Рисунок 10 – Уровень васкулоэндотелиального фактора роста и нейтрофильной эластазы в сыворотке крови при доброкачественных опухолях яичников и прогрессировании рака яичников

Примечание: ДОЯ - доброкачественные опухоли яичников, РЯ - рак яичников, NE - нейтрофильная эластаза, VEGF - васкулоэндотелиальный фактор роста.

Среди возможных причин можно назвать способность NE разрушать ангиогенные факторы, приводя к генерации диффундирующих фрагментов VEGF, стимулирующих рекрутирование воспалительных клеток.

Удалось установить, что ДОЯ сопровождались увеличением MMP-1 ($p=0,0516$), MMP-2 ($p=0,0001$), MMP-9 ($p=0,0042$) в кровотоке, при этом уровень MMP-13 ($p=0,0024$) снижался (*рисунок 11*).

При РЯ в сыворотке крови увеличивался уровень MMP-1 ($p=0,0021$) и TIMP-1 ($p=0,0437$), оставались неизменными MMP-13 и MMP-2, но снижался уровень MMP-9 ($p=0,0045$) по сравнению с результатами обследования пациентов с ДОЯ (*рисунок 11*). Не исключено, что MMP, увеличиваясь в периферической крови, создают условия для реализации циркулирующими Нф их прометастатической функции.

Таким образом, изменение цитокинового спектра дает возможность координировать опухолеассоциированное воспаление, способствующее прогрессированию РЯ.

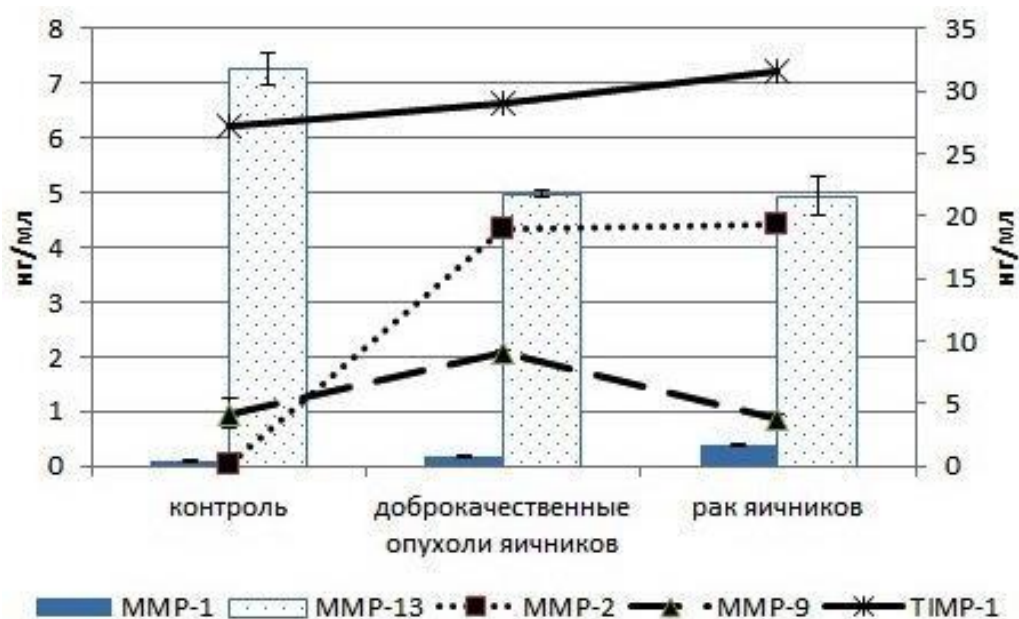


Рисунок 11 – Уровень матричных металлопротеиназ и тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы в сыворотке при доброкачественных опухолях и раке яичников

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; ` - данные статистически значимо отличаются от группы с доброкачественными опухолями яичников ($p \leq 0,05$), MMP - матричная металлопротеиназа, TIMP - тканевый ингибитор матричных металлопротеина.

ДОЯ характеризуются наличием циркулирующих провоспалительных IL-17A, IL-8, MCP-1, VEGF, NE, а также MMP-1, MMP-2, MMP-9. При прогрессировании РЯ концентрация IFN γ и IL-10 увеличивается, что, может свидетельствовать о неоднозначной роли противоопухолевых цитокинов. На усиление ангиогенных процессов при РЯ указывало увеличение уровня ростовых факторов: G-CSF, VEGF, MMP-1, MMP-9.

3.6 – Маркеры дифференцировки на этапе первичной диагностики злокачественных новообразований яичников и доброкачественных солидных опухолей

В унивариантном анализе логистической регрессии для дифференциальной диагностики между ДОЯ и РЯ статистическую значимость демонстрировали совместно растворимый IL-1 β (ОШ 2208.317 95% ДИ 14,379-339155,644, $p=0.003$), G-CSF (ОШ 0,883 95% ДИ 0,817-0,954, $p=0.002$) и IL-17A (ОШ 0,911 95% ДИ 0,834-0,996, $p=0.040$). Площадь под

кривой (AUC) модели составила 0,987, и РЯ мог быть диагностирован вероятностью 97,6% (Spec.=0,892, Sens.=0,976) (рисунки 12).

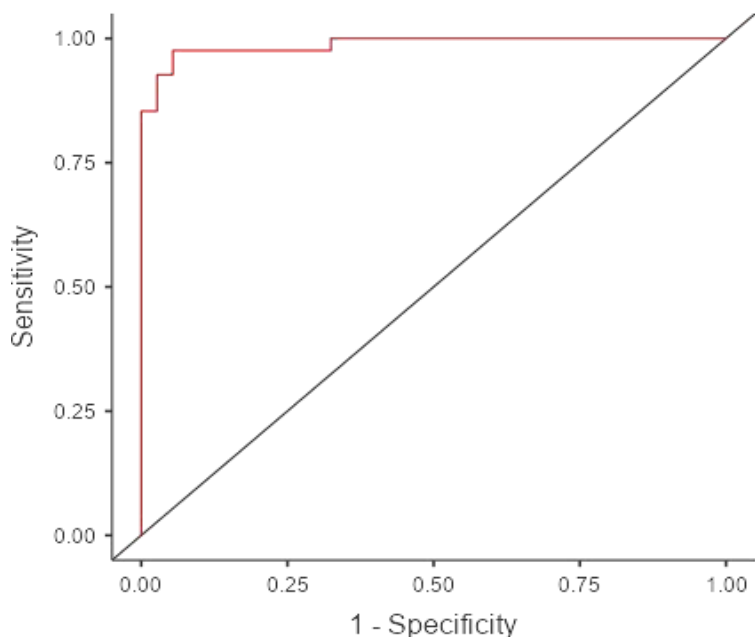


Рисунок 12 – ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики рака яичников и доброкачественных опухолей яичников с учетом показателей IL-1 β , G-CSF и IL-17A сыворотки крови

Риск возникновения РЯ возрастает при повышенном уровне IL-1 β , и одновременно сниженных уровнях в сыворотке крови G-CSF и IL-17A ($R^2=0,885$, $\chi^2=84,8$, $p=0,001$). Вероятность возникновения РЯ возрастает при повышенном уровне IL-1 β (более 1,697 пг/мл), и одновременно сниженных уровнях в сыворотке крови G-CSF (менее 0,749 пг/мл) и IL-17A (менее 52,796 пг/мл).

Также предиктивным значением в уравнении биномиальной регрессии обладают одновременно уровень МПО (ОШ 12979,95 95% ДИ 19,737-339,644, $p=0,004$), показатели спонтанного НСТ-теста (ОШ 476,98 95% ДИ 10,811-21045,1, $p=0,001$) и уровень IFN γ в Нф (ОШ 0,173 95% ДИ 0,058-0,517, $p=0,002$). Площадь под кривой (AUC) такой модели составила 0,989, и РЯ мог быть диагностирован вероятностью 95,1% (Spec.=0.946, Sens.=0.951) (рисунки 13). Риск возникновения РЯ возрастает при одновременно повышенном

уровне МПО (более 2,60 СЦК) и АФК (более 1,08 СЦК) в Нф, и сниженном уровне $IFN\gamma$ (менее 4,525 пг/мл) в Нф ($R^2=0,894$, $\chi^2=86,5$, $p=0,001$).

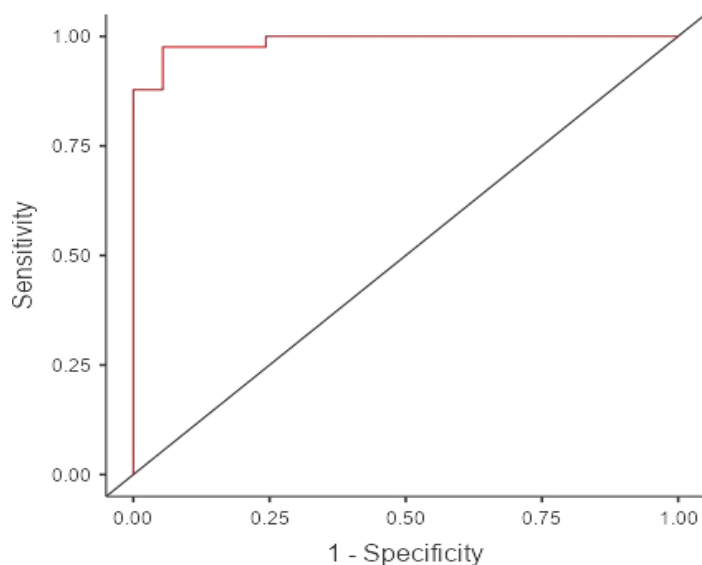


Рисунок 13 – ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики рака яичников и доброкачественных опухолях яичников с учетом показателей $IFN\gamma$, миелопероксидазы и активности в НСТ-тесте в нейтрофилах

Таким образом, при ДОЯ Нф с противоопухолевым фенотипом способны к завершённому фагоцитозу, имели повышенную активность МПО, повышенные уровни внутриклеточных $IFN\gamma$ и TIMP-1, а у проопухолевых Нф наблюдались повышенные концентрации проангиогенных факторов (внутриклеточных VEGF, MMP-1, MMP-2, NE, IL-6). Противоопухолевый фенотип Нф на всех стадиях РЯ определяли повышенные уровни: IL-2, IL-4, TIMP-1 в клетке, ригидность мембран, адгезивная способность. Нф с проопухолевым фенотипом обладали повышенной способностью к NETos, высоким содержанием G-CSF, MMP-1, MMP-2, MMP-9, VEGF, и экспрессией NF- κ B. Маркерами при дифференциальной диагностике РЯ и ДОЯ послужил комплекс определения растворимых IL-1 β , G-CSF и IL-17A или одновременное изучение активности МПО, $IFN\gamma$ в Нф. И активность последних в НСТ-тесте.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ
3-Й ГЛАВЫ**

Публикации в изданиях, рецензированных ВАК, и в международных реферативных базах данных Scopus и Web of Science

1. Цитокиновый статус и фенотип нейтрофилов периферической крови на терминальных стадиях рака яичников / Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, И.И. Антонеева, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг, М.А. Благовская // Российский иммунологический журнал. 2012. Т.6 (14), № 3 (1). С.60-61 (РИНЦ - 0.671).

2. Антонеева, И.И. Динамика изменений уровня цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) и их роль в развитии полимодальных локальных и дистантных эффектов при прогрессирующих формах рака яичников / И.И. Антонеева, Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, С.О. Генинг // Цитокины и воспаление. 2013. Т.12, № 4. С.43-49 (РИНЦ - 0.317).

3. Антонеева, И.И. Динамика уровня провоспалительных цитокинов и их роль в развитии полимодальных локальных эффектов при прогрессировании рака яичников / И.И. Антонеева, Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, С.О. Генинг // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т.15, № 4 (3). С.713-718 (РИНЦ - 0.347).

4. Генинг, С.О. Исследование матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови при прогрессировании рака яичников / С.О. Генинг, Т.В. Абакумова // Успехи современного естествознания. 2013. № 9. С.26-27. (РИНЦ - 0.300).

5. Иммунофенотип синдрома вторичного иммунодефицита при раке яичников / И.И. Антонеева, Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, О.С. Воронова, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг // Мед. альманах. 2013. № 5 (29). С.77-82. (РИНЦ - 0.474).

6. Показатели фагоцитарной активности и уровень матриксных металлопротеиназ нейтрофильных лейкоцитов на поздних стадиях рака яичников / Т.В. Абакумова, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг // Вестник РГМУ. 2013. № 1, спец.вып. С.5 (РИНЦ - 0.499).

7. *Абакумова, Т.В.* Изменение цитокинового статуса на поздних стадиях рака яичников / *Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг* // Вестник РГМУ. 2014. № 2. С.53-54 (РИНЦ - 0.499).

8. Влияние уровня провоспалительных цитокинов на образование внеклеточных нейтрофильных ловушек при распространенном раке яичников / *Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, И.И. Антонеева, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг* // Российский иммунологический журнал. 2019. Т.13 (22), № 2. С.704-706. (РИНЦ - 0.671).

9. The role of circulating neutrophils in the regulation of neoangiogenesis in ovarian cancer / *T. Abakumova, S. Gening, T. Gening, D. Dolgova, I. Antoneeva* // Annals of Oncology. 2019. Vol.30, Supplement 11. doi: 10.1093/annonc/mdz447|xi6 (WoS).

10. *Abakumova, T.* IL-8 in circulating neutrophils as a potential biomarker in ovarian cancer / *T. Abakumova, D. Dolgova, I. Myagdieva, T. Gening* // European Journal of Clinical Investigation. 2020. Vol.50, Issue S1. Special Issue: ESCI Virtual Meeting 2020. COVID Edition. P.69. doi I: 10.1111/eci.13369 (WoS).

11. Нейтрофилокины и морфофункциональное состояние циркулирующих нейтрофилов при опухолях яичников / *Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, И.И. Антонеева, С.О. Генинг, В.В. Гноевых* // Российский иммунологический журнал. 2021. Т.24, №3. С. 355-362. doi: 10.46235/1028-7221-985-NAT (РИНЦ - 0.671).

12. *Abakumova, T.* IL-17A and CCL2 in blood serum and circulating neutrophils in patients with ovarian tumors / *T. Abakumova, S. Gening, T. Gening* // J Clin Oncol. 2021. Vol.39, suppl 15; abstr e17536. doi:10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e17536 (WoS).

13. Влияние провоспалительных цитокинов на ригидность мембраны и морфофункциональное состояние циркулирующих нейтрофилов при опухолях яичников / *Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, С.О. Генинг, И.И. Антонеева, А.Б. Песков* // Медицинская иммунология. 2022. Т. 24, № 1. С. 1357-1366 (РИНЦ - 0.740, Scopus).

Публикации в других изданиях:

14. Матриксные металлопротеиназы при раке яичников / *Т.В. Абакумова, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг, Е.Г. Сидоренко, О.С. Воронова* // Украинский медико-биологический молодежный журнал. 2012. № 3, спец.вып. С.236-237.

15. Молекулярно-биологические факторы при прогрессировании рака яичников / *И.И. Антонеева, Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, Д.Р. Арсланова, Е.В. Васильева, С.О. Генинг* // Материалы Глобального онкологического форума EAFO (4-6 мая 2012, Москва). Москва, 2012. С.90-91.

16. Нейтрофилы периферической крови при распространенных стадиях рака яичников / *С.О. Генинг, Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг* // Тезисы докладов XXII Съезда физиологического общества им. И.П.Павлова (Москва-Волгоград, 16-20 сент. 2013). Москва; Волгоград, 2012. С.116.

17. *Абакумова, Т.В.* Рецепторный статус и ригидность мембраны нейтрофилов периферической крови при распространенном раке яичников / *Т.В. Абакумова, С.О. Генинг, Д.Р. Долгова, О.С. Воронова* // Украинский научно-медицинский молодежный журнал. 2013. Спец.вып. С.36.

18. *Абакумова, Т.В.* Фенотип нейтрофильных гранулоцитов при распространенном раке яичников / *Т.В. Абакумова, С.О.Генинг, Е.Г. Сидоренко* // Биология – наука XXI века: сб.тез. 17 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино, 21-26 апр. 2013г.). Пущино, 2013. С. 389.

19. Опухоловоассоциированная иммунопатология при распространенном раке яичников / *Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, И.И. Антонеева, О.С. Воронова, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг* // Ульяновский медико-биологический журнал. 2013. № 1. С.83-92.

20. Синдром вторичного иммунодефицита на терминальных стадиях рака яичников / *Т.В.Абакумова, И.И. Антонеева, Т.П. Генинг, С.О. Генинг, С.С. Пирмамедова, Д.Р. Долгова, И.В. Волгина* // Клиническая иммунология и аллергология-междисциплинарные проблемы: тр. междунар. форума (14-17 мая 2014 г., Казань). Казань, 2014. С.8-9.

21. Morphofunctional state of neutrophils and cytokine status in patients with ovarian cancer / *T.V. Abakumova, I.I. Antoneeva, T.P. Gening, D.R. Dolgova, S.O. Gening* // *J Mol Pathophysiol.* 2015. Vol.4, №1. P.1-5. doi: 10.5455/jmp.20150112022308.

22. Tumor-associated neutrophils in ovarian cancer / *T.Abakumova, T. Gening, D. Dolgova, S. Gening, I. Antoneeva* // *European Journal of Cancer Supplement.* 2015. Vol.13, № 1. P.17-18.

23. Функциональное состояние нейтрофилов при инкубации с аутологичными опухолевыми клетками / *Т.В.Абакумова, И.И. Антонеева, Т.П. Генинг, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг* // *Медико-физиологические проблемы экологии человека: материалы VI Всерос. конф. с междунар. участием (19-23 сент. 2016 г., г.Ульяновск).* Ульяновск, 2016. С.201.

ГЛАВА 4 – СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ДИСПЛАЗИИ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

С использованием цитохимических, иммуноферментных методов исследования, атомно-силовой и флуоресцентной микроскопии было оценено количество и морфо-функциональное состояние Нф при цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) и на разных стадиях рака шейки матки (РШМ).

4.1 – Оценка нейтрофильно-лимфоцитарного отношения, ригидности мембраны и экспрессии дифференцировочных антигенов нейтрофилов в периферической крови пациенток на разных стадиях цервикальной интраэпителиальной неоплазии

В результате проведенного нами исследования выявлено снижение NLR при дисплазии шейки матки (CIN) ($1,75 \pm 0,12$ против $2,22 \pm 0,07$ в контроле, $p=0,0033$) при тенденции к снижению абсолютного количества лейкоцитов ($6,02 \pm 0,27 \times 10^9/\text{л}$ против $6,54 \pm 0,22 \times 10^9/\text{л}$ в контроле, $p=0,1773$) (рисунк 14). На начальной стадии РШМ на фоне незначимого снижения количества лейкоцитов ($5,60 \pm 0,36 \times 10^9/\text{л}$ против $6,02 \pm 0,27 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,3414$)) наблюдалось повышение NLR по сравнению с CIN ($2,36 \pm 0,41$ против $1,75 \pm 0,12$ ($p=0,0986$)) (рисунк 14). При местноограниченном процессе NLR повышался по сравнению с аналогичным показателем при CIN ($2,61 \pm 0,25$ против $1,75 \pm 0,12$, $p=0,0008$). При распространенном процессе по сравнению с контролем (p_1), CIN (p_2) и предыдущей стадией (p_3) выявлен лейкоцитоз ($9,95 \pm 1,62 \times 10^9/\text{л}$, $p_1=0,0107$, $p_2=0,0009$, $p_3=0,0118$) и выраженное увеличение NLR ($4,29 \pm 0,39$, $p_1=0,0001$, $p_2=0,0001$, $p_3=0,0096$) (рисунк 14), что обусловлено усилением системного воспаления при прогрессировании РШМ.

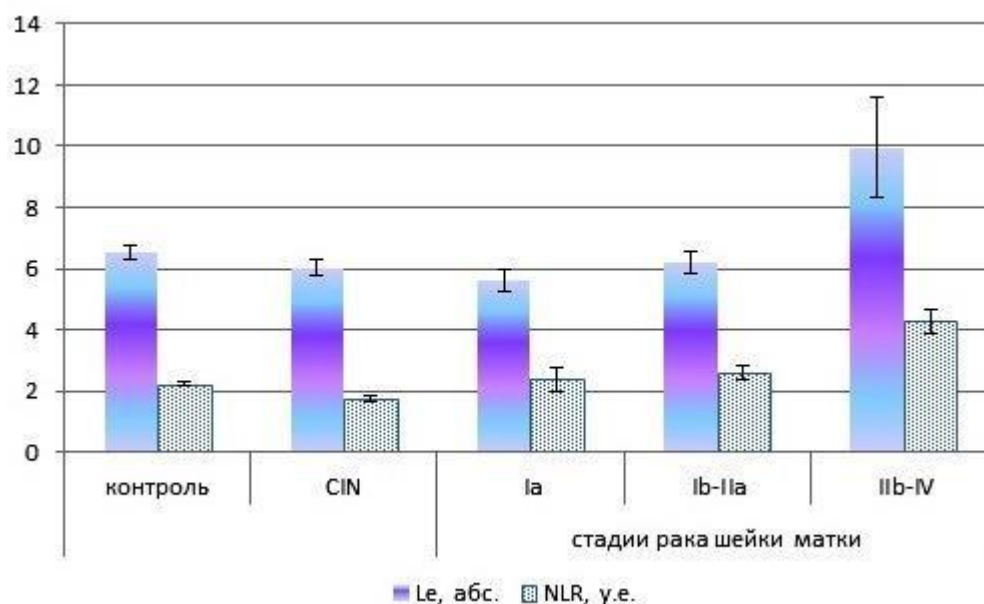


Рисунок 14 – Общее количество лейкоцитов и NLR у больных CIN и на различных стадиях рака шейки матки

Примечание: CIN - цервикальная интраэпителиальная неоплазия, Le - лейкоциты, NLR - нейтрофильно-лимфоцитарное отношение

При оценке фенотипа Нф циркулирующей крови нами было выявлено увеличение количества CD11b⁺Нф при CIN и Ib-IIa РШМ по сравнению с контрольной группой. Кроме того, количество CD11b⁺Нф было ниже при Ia и IIb-IV стадиях РШМ по сравнению с CIN (таблица 19).

Таблица 19 – Количество нейтрофилов с различным фенотипом при CIN и на различных стадиях рака шейки матки (M±m)

Группа Показатель	Контроль, n=22	CIN, n=32	Стадии рака шейки матки		
			Ia, n=21	Ib-IIa, n=16	IIb-IV, n=13
CD11b ⁺ , %	60,40±7,76	97,00±2,30	69,14±8,86	88,00±7,82	71,72±5,70
p		p ₁ =0,0093	p ₂ =0,0019	p ₁ =0,0010 p ₃ =0,0219	p ₂ =0,0076
CD16 ⁺ , %	98,90±0,74	98,66±0,84	92,86±1,78	94,0±3,68	90,72±2,62
CD63 ⁺ , %	34,90±7,38	50,00±16,66	38,56±16,06	35,60±14,84	27,56±5,94
p					p ₂ =0,0106
CD95 ⁺ , %	38,54±6,18	41,32±7,78	48,00±14,76	37,20±16,32	27,56±4,98
p					p ₂ =0,0562

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

Количество CD16⁺Нф при CIN и на различных стадиях РШМ находилось в пределах коридора нормы. Однако по сравнению с CIN на Ib-IV стадии РШМ снижалось количество CD63⁺Нф и CD95⁺Нф (*таблица 19*).

Полученные данные по экспрессии CD11b на мембране Нф при CIN и РШМ сопоставимы с данными при РЯ, однако, динамика экспрессии CD16, CD63, CD95 различна на разных стадиях РЯ и РШМ.

При оценке ригидности мембраны Нф методом АСМ установлено, что при CIN - $39,47 \pm 5,42$ МПа ($p=0,0612$), на Ia стадии РШМ - $31,19 \pm 2,46$ МПа ($p=0,0421$), на Ib-IV - $51,93 \pm 1,53$ МПа ($p=0,1732$) изменялась по сравнению с контролем ($47,49 \pm 2,55$ МПа), а на Ib-IV стадии было установлено значимое и резкое её увеличение - $81,84 \pm 8,33$ МПа ($p=0,0062$), против $47,49 \pm 2,55$ МПа в контроле. Это свидетельствует о том, что мембрана Нф при прогрессировании становится более эластичной и микрофагам легче мигрировать в область опухолевого роста.

При сканировании Нф пациентов CIN в жидкой среде видно, что клетка распластана на подложке, границы клетки четко видны, в цитоплазме дифференцируются гранулы цитоплазмы (*рисунок 15*).

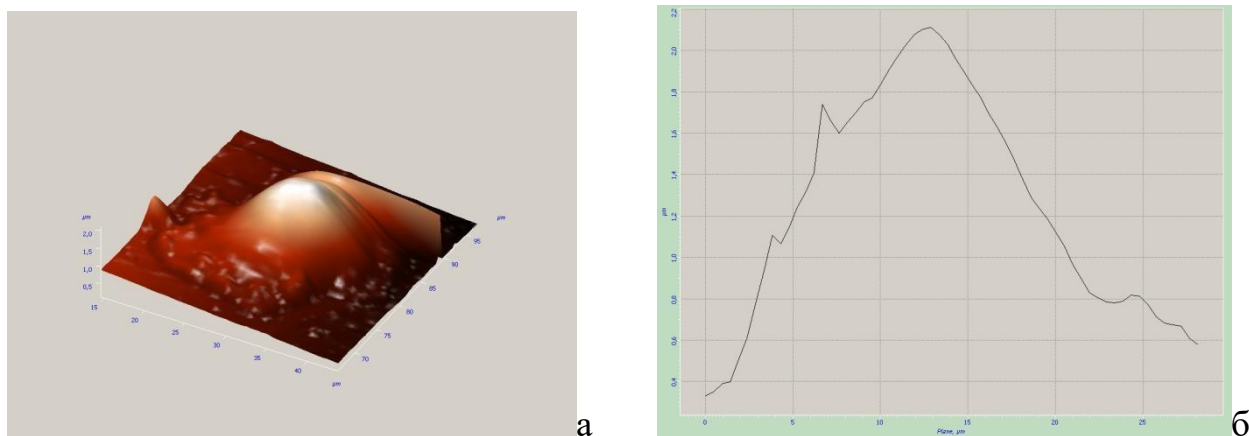


Рисунок 15 – Нейтрофил пациентки с CIN после сканирования в жидкой среде (результат сканирования в 3D (а), боковое сечение профиля клетки (б))

Полученное изображение Нф пациентки при РШМ Ia после фиксации метанолом позволило увидеть четко выраженное сегментированное ядро,

которое занимает почти всю цитоплазму клетки, без выраженных гранул (*рисунок 16*).

При сканировании в жидкой среде Нф при РШМ на Ib стадии визуализировалась четкая округлая форма, без микровыростов, ядерные структуры сконцентрированы ближе к центру, клетки не распластаны по подложке, практически вся цитоплазма сконцентрирована возле ядра, гранулы цитоплазмы практически не идентифицировались (*рисунок 17*).

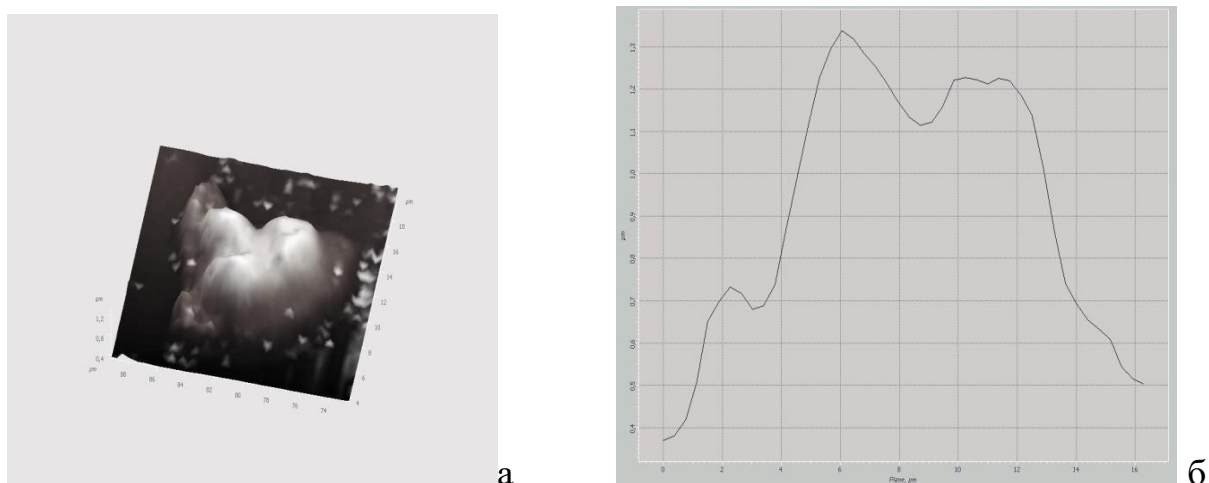


Рисунок 16 – Нейтрофил пациентки при раке шейки матки Ia стадии при фиксации метанолом (результат сканирования в 3D (а), боковое сечение профиля клетки (б))

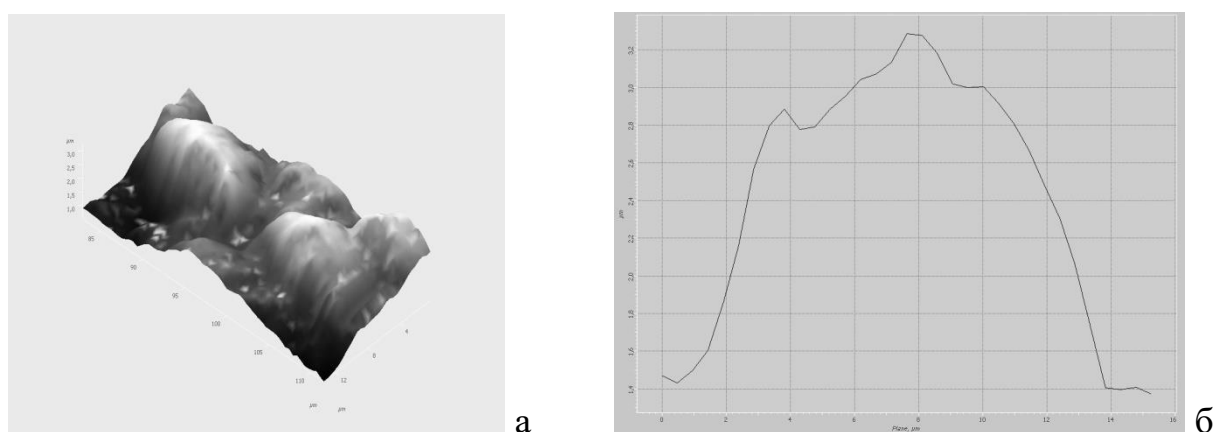


Рисунок 17 – Нейтрофилы пациентки при раке шейки матки Ib стадии после сканирования в жидкой среде (результат сканирования в 3D (а), боковое сечение профиля клетки (б))

При фиксации Нф глутаровым альдегидом сканирование позволило наблюдать четко выраженные границы клетки и сегментированное ядро (рисунк 18).

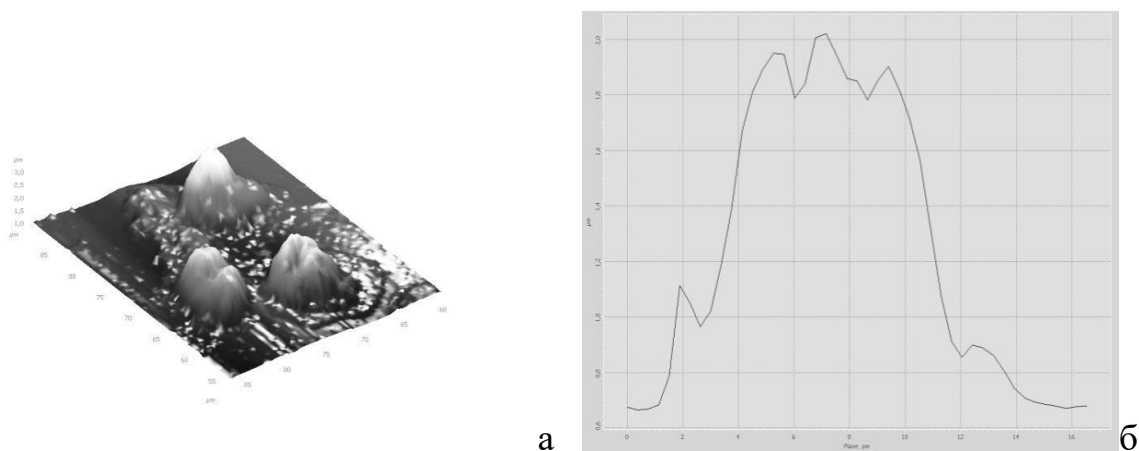


Рисунок 18 – Нейтрофилы пациентки при раке шейки матки Ib стадии, фиксированный глутаровым (результат сканирования в 3D (а), боковое сечение профиля клетки (б))

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать снижение ригидности мембраны Нф и повышение экспрессии молекулы адгезии при местноограниченном РШМ, что свидетельствует об увеличении пластичности гранулоцитов. Количество циркулирующих Нф, проявляющих активированный фенотип (CD11b⁺) повышалось уже при CIN. При распространенном РШМ на фоне нейтрофилеза снижалось количество Нф, способных к дегрануляции и апоптозу.

4.2 – Показатели кислородзависимого киллинга нейтрофилов периферической крови при дисплазии и раке шейки матки

В результате проведенного исследования выявлено снижение показателей фагоцитоза на Ib-IIa стадии РШМ. При CIN, Ia, Ib-IIa РШМ Нф не способны к завершённому фагоцитозу (ИЗФ был менее 1) (таблица 20). Однако при CIN в Нф повышалась уровень МПО и активность Нф в НСТ-тесте (рисунк 19). При прогрессировании РШМ активность МПО повышалась, а

способность продуцировать АФК оставалась значимо ниже относительно таковой в группе контроля и при CIN.

Таблица 20 – Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов при CIN и прогрессировании рака шейки матки (M±m)

Группа / Показатель	Контроль, n=22	CIN, n=32	Стадии рака шейки матки		
			Ia, n=21	Ib-IIa, n=16	IIb-IV, n=13
ФИ, %	41,20±6,44	43,20±14,01	39,42±5,75	32,14±5,06*	33,25±6,77
ФЧ, у.е.	1,97±0,17	1,76±0,28	1,50±0,07*	1,40±0,08*`	1,33±0,08*
ИЗФ, у.е.	1,04±0,14	0,60±0,05	0,59±0,06	0,88±0,05	1,13±0,16

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; ` - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; ° - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии ($p \leq 0,05$), ИЗФ - индекс завершенности фагоцитоза, ФИ - фагоцитарный индекс, ФЧ - фагоцитарное число

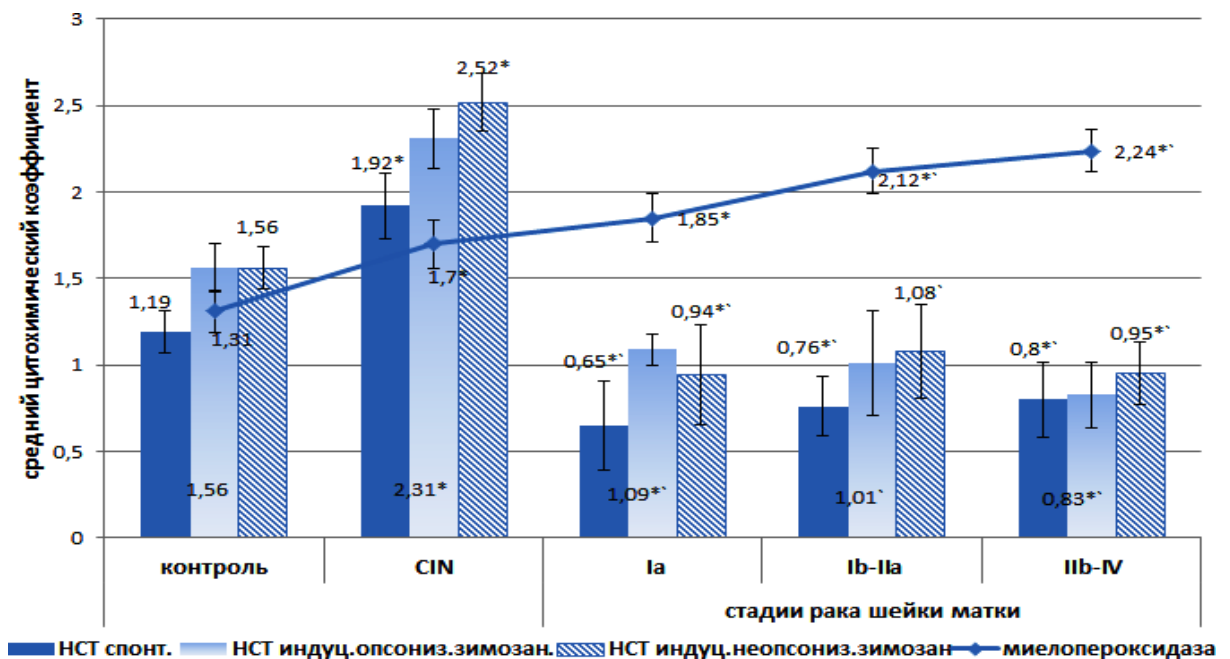


Рисунок 19 – Активность миелопероксидазы и показатели НСТ-теста нейтрофилов при CIN и на разных стадиях рака шейки матки

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; ` - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; ° - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии ($p \leq 0,05$)

Данные по изменению доли активных Нф в НСТ-тесте и способность к завершенному фагоцитозу при прогрессировании РШМ сопоставимы с данными

при прогрессировании РЯ. Динамика активности МПО в Нф при РШМ и РЯ имеет разнонаправленный характер.

Таким образом, при CIN при сниженной фагоцитарной активности в Нф увеличивался синтез МПО и АФК. Прогрессирование РШМ сопровождалось повышением способности к завершённому фагоцитозу и уровня МПО, а также снижением активности Нф в НСТ-тесте. Однако увеличение синтеза МПО и АФК коррелировало с возрастанием ЧЛ. Наблюдаемое увеличение способности к завершённому фагоцитозу может свидетельствовать о развитии хронического воспаления на терминальной стадии РШМ.

4.3 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и на разных стадиях рака шейки матки

В результате проведенных нами исследований установлено значимое возрастание числа NET, образованных Нф пациенток с распространенным РШМ, как по сравнению с контролем ($p=0,0276$), так и по сравнению с Нф пациенток с дисплазией ($p=0,0512$). При этом ИЛ значимо возрастал при CIN ($p=0,0127$) и значимо снижался при прогрессировании РШМ по сравнению с контролем ($p=0,0048$) и CIN ($p=0,0016$) (*рисунок 20*). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что киллинговая функция NET, максимальная при CIN, снижалась при прогрессировании РШМ. При этом способность к NETos возрастала от CIN до распространенного РШМ, что, вероятно, способствует прогрессированию данного типа рака.

Данные, по параметрам NETs, полученные при распространенном РШМ соотносятся с аналогичными показателями при распространенном РЯ.

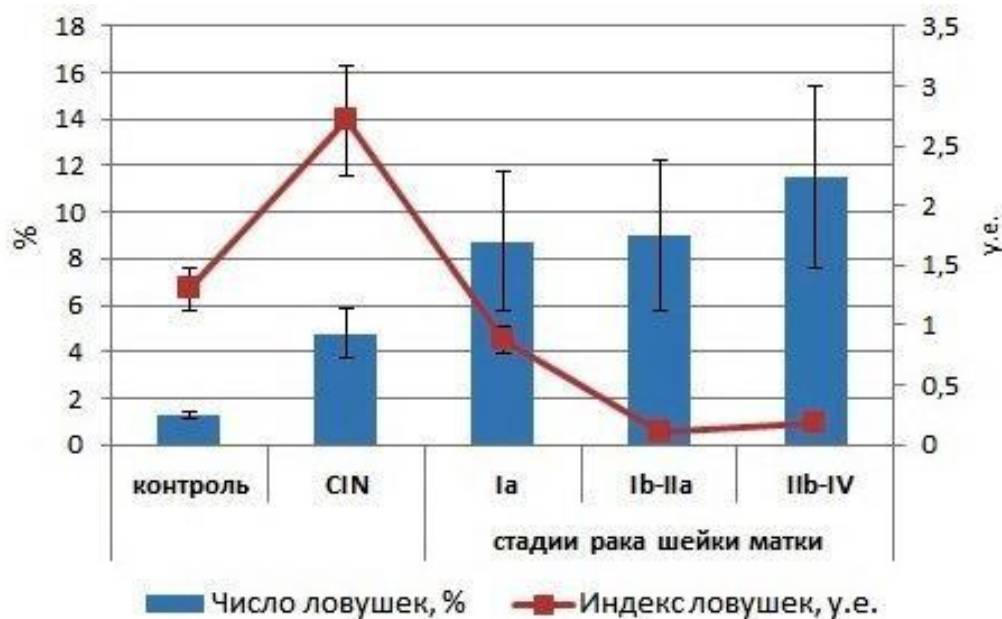


Рисунок 20 – Показатели NETs при CIN и прогрессировании рака шейки матки

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; ` - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; ° - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии ($p \leq 0,05$)

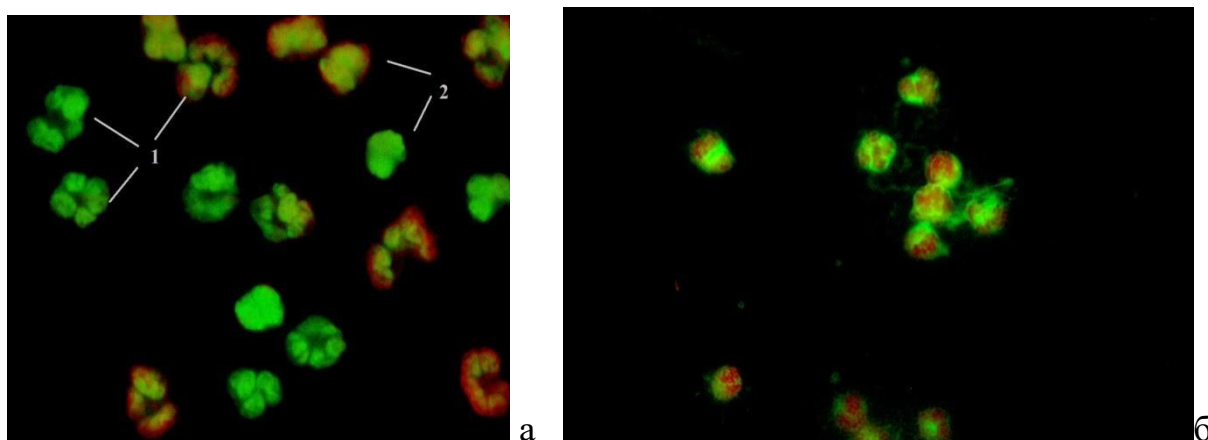


Рисунок 21 - Нейтрофилы пациенток при раке шейки матки, окрашенные акридиновым оранжевым, а - 1 - нейтрофилы с сегментированным ядром, 2 – нейтрофилы с недифференцированным ядром, б - NET, микрофото, $\times 1000$

При этом как и при РЯ имел место лейкоцитоз, повышенное NLR, повышенная экспрессия рецептора адгезии CD11b, неизменная экспрессия рецептора фагоцитоза CD16. Но экспрессия CD95, характеризующего готовность к апоптозу, повышенная на терминальных стадиях РЯ, при РШМ

была снижена. Экспрессия CD63 - показателя готовности к дегрануляции, повышенная при РЯ, при РШМ была также снижена.

4.4 – Уровень про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, NF-κB, нейтрофильной эластазы, васкулоэндотелиального фактора, матриксных металлопротеиназ в лизате нейтрофилов при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и на разных стадиях рака шейки матки

В результате проведенных нами исследований было выявлено значимое снижение IL-1β в Нф при местноограниченном РШМ в сравнении с контролем (в 2,5 раза) и начальной стадией РШМ (в 4 раза). При распространенном РШМ наблюдалось повышение IL-1β в Нф по сравнению с контролем (в 4,5 раза), CIN (в 3 раза) и местноограниченном РШМ (в 12 раз) (*таблица 21*).

Концентрация IL-1RA в лизате Нф значимо снижалась при CIN в 18 раз, и была выше на стадиях Ia (в 1,8 раз) и Ib-IIa (в 1,5 раза) РШМ по сравнению с контролем. На всех стадиях РШМ уровень IL-1RA в лизате Нф был значимо выше такового при CIN (*таблица 21*). Разнонаправленная динамика IL-1β и IL-1RA в Нф, возможно, свидетельствует о блокировании проопухолевого функции Нф при местноограниченном РШМ.

Изучение полученных данных показало, что на Ib-IIa стадии РШМ уровень IL-17A в лизате Нф значимо снижался в сравнении с группой контроля (в 2,4 раза), CIN (в 1,8 раз) и Ia стадией (в 2,5 раза) РШМ. На стадии Ib-IV уровень IL-17A в лизате Нф становился значимо выше контроля в 1,5 раза (*таблица 21*). Усиление продукции этого провоспалительного и ангиогенного цитокина может служить подтверждением повышения проопухолевого активности Нф на этих стадиях РШМ.

Уровень IL-18 в лизате Нф при CIN имел тенденцию к повышению, а при РШМ Ia (в 3 раза) и Ib-IIa (в 5 раз) значимо снижался, что способствует снижению активации сигнальных молекул NF-κB. На Ib-IV стадии РШМ

уровень IL-18 в лизате Нф снова повышался в 2,5 раза по сравнению Ib-Па стадией, но не достигал контроля (таблица 21).

Таблица 21 – Уровень цитокинов семейства IL-1, IL-17A, G-CSF в лизате циркулирующих нейтрофилов при CIN и раке шейки матки

Группа		Контроль, n=22	CIN, n=32	Стадии рака шейки матки		
				Ia, n=21	Ib-Па, n=16	IIb-IV, n=13
Показатель (пг/мл)						
IL-1 β	Me (Q1-Q3)	8,941 (3,764-15,659)	11,719 (6,689-25,665)	12,948 (0-35,362)	3,411 (2,575-4,932)	37,663 (10,631-54,816)
	p				p ₁ =0,0040 p ₃ =0,0110	p ₁ =0,0030 p ₂ =0,0570 p ₃ =0,0020
IL-17A	Me (Q1-Q3)	1681,276 (892,491-2983,449)	89,284(71,628-148,492)	2998,371 (2317,232-3000,000)	2599,388 (1998,392-3000,000)	1383,359 (1037,483-1983,487)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0003 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0203 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0113	p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0119
IL-18	Me (Q1-Q3)	45,296 (39,776-54,765)	35,064 (15,310-70,493)	47,692 (8,705-118,604)	19,010 (10,339-25,486)	68,628 (45,392-83,298)
	p				p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0182 p ₃ =0,0063	p ₁ =0,0027 p ₃ =0,0001
G-CSF	Me (Q1-Q3)	0,125 (0,057-0,141)	9,178 (3,043-25,231)	0,009 (0-0,060)	1,708 (1,321-1,983)	1,699 (0,934-2,853)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0003 p ₂ =0,0031 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0051 p ₂ =0,0231

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

Повышение в 73 раза уровня G-CSF в лизате Нф при CIN, скорее всего, связано с активацией сигнальных путей PI3K/NF-kB в Нф и усилением проангиогенных свойств. На начальной стадии РШМ уровень G-CSF в лизате Нф значительно снижался по сравнению с контролем. На Ib-IIa и IIb-IV стадиях

РШМ вновь повышался относительно контроля, но был значительно ниже такового при CIN (таблица 21). Динамика цитокинов в лизате циркулирующих Нф при CIN и РШМ значительно отличалась от таковой при РЯ.

Проопухолевую активность при CIN также подтверждали повышенные в лизате Нф в 2 раза уровни IL-2 и TNF α , в 7 раз - IL-6 (таблица 22).

Таблица 22 – Провоспалительные цитокины в лизате циркулирующих нейтрофилов при CIN и раке шейки матки

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	CIN, n=32	Стадии рака шейки матки		
				Ia, n=21	Ib-IIa, n=16	IIb-IV, n=13
IL-2	Me (Q1- Q3)	3,907 (3,423- 4,359)	7,423 (6,287- 9,245)	59,027 (10,620- 97,459)	59,890 (30,409- 84,698)	73,306 (62,018- 84,397)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001
IL-6	Me (Q1- Q3)	1,329 (0,992- 1,993)	10,573 (8,784- 13,118)	2,126 (1,326- 3,414)	18,297 (12,098- 21,654)	6,475 (5,027- 7,325)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0014 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0001
TNF α	Me (Q1- Q3)	2,370 (1,128- 3,163)	3,995 (1,219- 6,484)	6,455 (4,900- 7,900)	7,900 (5,958- 9,517)	10,025 (6,970- 12,874)
	p		p ₁ =0,0103	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0041	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0559 p ₃ =0,0008	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0003

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

При прогрессировании РШМ уровень IL-2 в лизате Нф повышался в 10 раз, TNF α - в 5 раз относительно группы с CIN (таблица 22). IL-6 повышался в 1,8 раза при местноограниченном процессе по сравнению с аналогичными показателями при CIN (таблица 22). Уровень IL-2 в Нф при патологии шейки матки значимо не отличается от такового при РЯ.

Установлено, что CIN и местноограниченный РШМ сопровождался повышением уровня IL-4 в Нф. При распространенном РШМ уровень IL-4 в лизате Нф снижался в 3 раза и был ниже аналогичных показателей в группе контроля (таблица 23), что не соотносится с данными при РЯ.

Таблица 23 – Уровень противовоспалительных цитокинов в лизате циркулирующих нейтрофилов при CIN и раке шейки матки

Группа		Контроль, n=22	CIN, n=32	Стадии рака шейки матки		
				Ia, n=21	Ib-IIa, n=16	IIb-IV, n=13
Показатель (пг/мл)						
IL-4	Me (Q1-Q3)	1,457 (0,591-2,069)	3,215 (1,886-6,301)	1,723 (1,039-4,205)	3,335 (1,067-4,901)	0,955 (0,826-0,970)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0300 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₃ =0,0132	p ₁ =0,0286 p ₂ =0,0004 p ₃ =0,0008
IL-10	Me (Q1-Q3)	63,961 (48,981-88,843)	9,606 (5,167-15,427)	96,926 (15,039-141,795)	91,740 (73,485-121,649)	12,701 (2,735-39,298)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0094 p ₂ =0,0001	p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0424 p ₃ =0,0065
IFN γ	Me (Q1-Q3)	2,517 (1,661-3,664)	11,572 (9,026-14,526)	3,270 (1,060-6,470)	3,433 (1,236-4,023)	4,345 (2,212-5,790)
	p		p ₁ =0,0001	p ₂ =0,0001	p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0386 p ₂ =0,0001

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

Уровень IL-10 в лизате Нф ниже в 7 раз при CIN по сравнению с контролем. Однако на Ia стадии РШМ резко возростал и был в 1,5 раза выше аналогичного уровня в контроле. При распространенном процессе уровень IL-10 снижался, но был ниже такового в контроле, что также наблюдается при распространенном РЯ (таблица 23).

Выявлено значимое повышение IFN γ в лизате Нф при CIN, которое также прослеживалось при ДОЯ. На разных стадиях РШМ его уровень был значимо ниже такового при CIN (таблица 23). Таким образом, интерфероновая противоопухолевая активность Нф при прогрессировании РШМ и РЯ была снижена.

При оценке уровня хемокинов в лизате Нф выявлено значимое снижение IL-8 на разных стадиях РШМ относительно группы с CIN (таблица 24), что не соотносится с аналогичными данными при РЯ.

Таблица 24 – Уровень хемокинов в лизате нейтрофилов при CIN и раке шейки матки

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	CIN, n=32	Стадии рака шейки матки		
				Ia, n=21	Ib- IIa, n=16	IIb-IV, n=13
IL-8	Me (Q1- Q3)	158,826 (140,048- 186,034)	157,951 (108,694- 198,365)	34,452 (11,249- 107,465)	62,409 (47,369- 86,371)	33,258 (19,461- 44,617)
	p			p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0008 p ₃ =0,0473	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0025
MCP-1	Me (Q1- Q3)	17,217 (14,029- 19,561)	21,606 (16,906- 30,534)	24,979 (22,324- 27,558)	20,536 (19,524- 21,197)	23,476 (17,775- 38,047)
	p		p ₁ =0,0194	p ₁ =0,0003	p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0070 p ₃ =0,0187

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

Однако уровень MCP-1 в лизате Нф уже при CIN значимо повышался по сравнению с контролем и оставался высоким при РШМ Ia и Ib-IIa (таблица

24), что усиливает проопухолевую активность Нф на этих стадиях роста опухоли.

В результате проведенного нами исследования выявлено значимое повышение экспрессии NF-κB в ядерной фракции Нф при CIN и на всех стадиях РШМ по сравнению с контролем (таблица 25).

Таблица 25 – Уровень ядерного фактора-κB, васкулоэндотелиального фактора и нейтрофильной эластазы в лизате нейтрофилов крови при CIN и прогрессировании рака шейки матки

Группа Показатель		Контроль, n=22	CIN, n=32	Стадии рака шейки матки		
				Ia, n=21	Ib-IIa, n=16	IIb-IV, n=13
NF-κB, мг/мл	Me (Q1- Q3)	0,174 (0,125- 0,201)	0,192 (0,165- 0,256)	0,453 (0,006- 0,748)	0,521 (0,403- 0,621)	0,332 (0,272- 0,396)
	p		p ₁ =0,0259	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0004	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0567 p ₃ =0,0007
VEGF, пг/мл	Me (Q1- Q3)	48,940 (40,989- 52,851)	92,849 (68,423- 119,752)	81,524 (53,634- 98,797)	78,026 (73,954- 83,259)	251,959 (241,587- 267,159)
	p		p ₁ =0,0002	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0572	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0393	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0001
NE, нг/мл	Me (Q1- Q3)	0,361 (0,264- 0,412)	0,617 (0,497- 0,817)	2,180 (1,890- 2,380)	0,888 (0,758- 1,007)	0,982 (0,885- 1,100)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0476 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0100

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

Уровень внутриклеточного VEGF при CIN был в 2 раза выше, чем в контрольной группе. На Ia и Ib-IIa стадиях РШМ уровень VEGF в лизате Нф снижался относительно такового в группе с CIN, но оставался значимо выше, чем в группе контроля. При распространенном РШМ уровень VEGF в лизате

Нф был выше такого при CIN более чем в 2 раза (таблица 25). Вероятно, Нф, обладая уже при CIN повышенным арсеналом проопухолевых факторов, могут способствовать ангиогенезу и эпителиально-мезенхимальному переходу. Это было сопоставимо с изменениями, выявленными при изучении лабораторных данных пациентов при ДОЯ и РЯ.

По нашим данным, уровень NE в лизате Нф значительно повышался при CIN и на разных стадиях РШМ. При прогрессировании опухолевого процесса уровень NE в лизате Нф был выше относительно группы с CIN (таблица 25). NE расщепляет воспалительные цитокины и хемокины, что объясняет в определенной степени это повышение.

В результате проведенных исследований было выявлено значимое повышение уровня MMP-2 при CIN ($p=0,0001$) и при РШМ ($p=0,0001$) (рисунок 22).

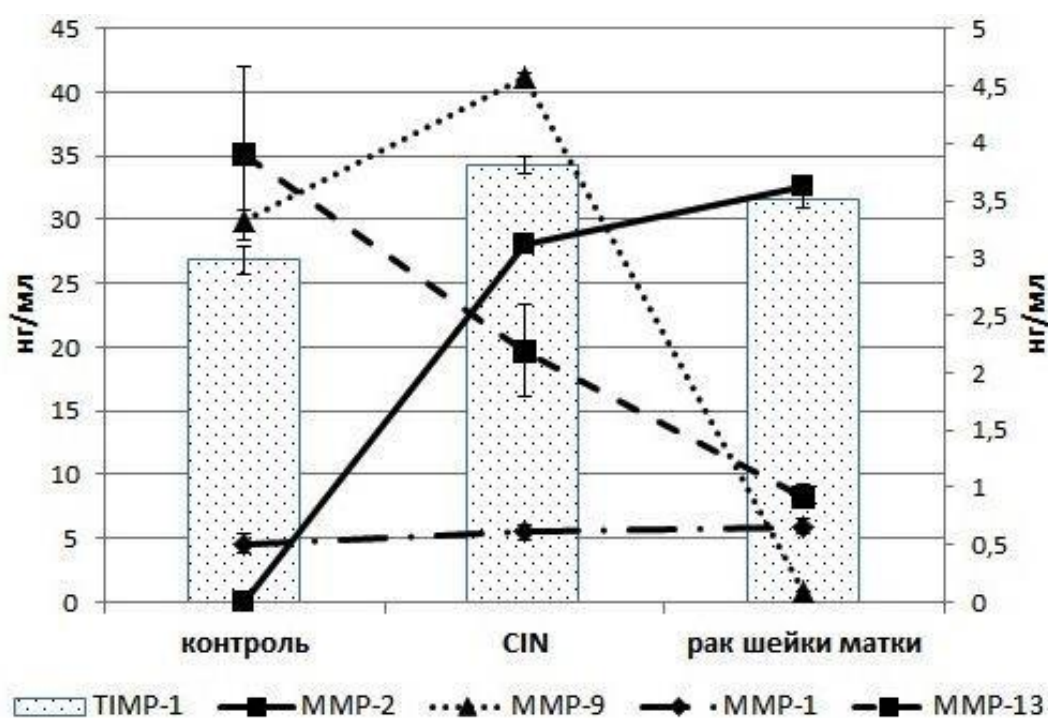


Рисунок 22 – Уровень матричных металлопротеиназ и тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы в нейтрофилах при CIN и раке шейки матки
Примечание: CIN - цервикальная интраэпителиальная неоплазия, MMP - матричная металлопротеиназа, TIMP - тканевый ингибитор матричных металлопротеиназ

Уровень MMP-9 также значимо повышался при CIN ($p=0,0001$), а при РШМ снижался ($p=0,0001$). Таким образом, усиливались проангиогенные свойства Нф уже при CIN.

Уровень MMP-13 значимо снижался при CIN ($p=0,0491$) и продолжал снижаться при РШМ ($p=0,0005$). TIMP-1 при CIN ($p=0,0001$) и РШМ ($p=0,0416$) значимо увеличивался в сравнении с контролем. Уровень MMP-1 при CIN и РШМ находился в пределах коридора нормы (*рисунок 22*). Данные по изменению TIMP-1 и MMP-13 были сопоставимы с изменениями, выявленными при изучении лабораторных данных пациентов при РЯ.

На основании вышеизложенного можно полагать, что уже при CIN в лизате Нф регистрируются значимые изменения цитокинового спектра, которые могут свидетельствовать о формировании проопухолевого фенотипа Нф, а именно: повышенные уровни G-CSF, IL-6, MCP-1, VEGF, MMP-2, MMP-9. При прогрессировании РШМ проопухолевые Нф содержат повышенный уровень NF-kB, IL-1 β , VEGF, NE, MMP-2.

4.5 – Уровень цитокинов, васкулоэндотелиального фактора, нейтрофильной эластазы и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови пациентов при CIN и раке шейки матки

В результате проведенных нами исследований выявлено значимое повышение IL-1 β при CIN и начальной стадии и распространенном РШМ по сравнению с группой контроля (*таблица 26*). Это соотносится с аналогичными данными при РЯ. При CIN и на всех стадиях РШМ концентрация циркулирующего IL-1RA была значимо повышена в сравнении с таковыми показателями в группе контроля (*таблица 26*). Аналогичная динамика IL-1RA имела место при РЯ. По нашему мнению, повышение уровня IL-1 β сопровождается синхронным увеличением уровня IL-1RA в сыворотке, необходимым для блокирования системного провоспалительного эффекта.

Таблица 26 – Уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови при CIN и раке шейки матки

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	CIN, n=32	Стадии рака шейки матки		
				Ia, n=21	Ib-IIa, n=16	IIb-IV, n=13
IL-1 β	Me (Q1- Q3)	1,811 (1,582- 2,182)	5,548 (3,699- 8,686)	9,756 (0,730- 16,370)	1,798 (1,188- 2,192)	3,202 (1,540- 7,209)
	p		p ₁ =0,0050	p ₁ =0,0420	p ₃ =0,0010	p ₁ =0,0020 p ₃ =0,0007
IL-1RA	Me (Q1- Q3)	200,209 (179,882- 266,188)	603,765 (264,343- 806,006)	332,743 (188,382- 656,176)	336,651 (215,537- 387,879)	567,066 (472,943- 674,624)
	p		p ₁ =0,0002	p ₁ =0,0013	p ₁ =0,0068 p ₂ =0,0141	p ₁ =0,0001 p ₃ =0,0046
IL-2	Me (Q1- Q3)	2,531 (1,524- 3,015)	3,795 (3,573- 3,991)	22,612 (11,182- 30,736)	10,071 (3,321- 13,452)	9,244 (4,466- 16,717)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0002 p ₂ =0,0002 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0075 p ₂ =0,0041
IL-6	Me (Q1- Q3)	16,883 (2,189- 31,550)	9,105 (7,995- 11,021)	62,954 (30,800- 171,740)	1,238 (0,993- 2,626)	11,258 (8,258- 12,963)
	p		p ₁ =0,0314	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0016 p ₂ =0,0006 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,1183 p ₃ =0,0001
IL-17A	Me (Q1- Q3)	41,479 (39,484- 47,297)	23,25 (16,099- 34,369)	38,491 (14,968- 107,065)	85,915 (29,088- 154,654)	28,714 (21,473- 35,157)
	p		p ₁ =0,0001	p ₂ =0,0099	p ₁ =0,0069 p ₂ =0,0005 p ₃ =0,0050	p ₁ =0,0070 p ₃ =0,0187
IL-18	Me (Q1- Q3)	299,901 (152,369- 379,252)	424,886 (366,917- 477,441)	499,931 (359,345- 543,092)	386,541 (376,583- 396,357)	460,067 (415,259- 526,124)
	p		p ₁ =0,0056	p ₁ =0,0050	p ₂ =0,0451 p ₃ =0,0002	p ₁ =0,0182 p ₃ =0,0005
TNF α	Me (Q1- Q3)	1,431 (0,971- 5,924)	3,654 (3,028- 4,385)	12,753 (4,400- 31,210)	9,665 (6,338- 13,154)	7,640 (5,920- 12,310)
	p			p ₁ =0,0015 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0591 p ₂ =0,0001	p ₂ =0,0004

<i>Продолжение таблицы 26</i>						
G-CSF	Me (Q1-Q3)	52,215 (45,987-55,941)	36,926 (33,937-38,937)	29,016 (26,916-31,935)	18,886 (9,096-25,115)	13,196 (7,385-22,151)
	p		p ₁ =0,0009	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0046	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0007 p ₃ =0,0016	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0005

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

Уровень IL-2 в сыворотке значимо повышен при CIN и на всех стадиях РШМ по сравнению с аналогичными показателями в группе контроля. А при РШМ его уровень значимо выше, чем при CIN (*таблица 26*), что может усиливать рекрутирование Нф при патологии шейки матки.

Концентрация IL-18 в сыворотке повышалась в 1,4 раза при CIN, в 1,6 раз на Ia и Ib-IV стадиях РШМ по сравнению с аналогичными показателями в группе контроля, что может усилить цитотоксичность Нф и индуцировать воспаление. На Ib-IIa стадии РШМ его уровень на 23% ниже такового при CIN (*таблица 26*).

На разных стадиях РШМ значимо повышался уровень TNF α в сыворотке по сравнению с аналогичными данными при CIN (*таблица 26*).

А уровень G-CSF в сыворотке пациентов при CIN (на 30%) и при прогрессировании РШМ (на 44%, 65%, 75% соответственно) был значимо ниже такового в группе контроля (*таблица 26*). Это соответствует динамике TNF α и G-CSF в сыворотке пациентов при РЯ.

Согласно полученным данным, уровень IL-4 в сыворотке пациентов при CIN и РШМ значимо повышался по сравнению с контролем, но на Ib-IIa и Ib-IV стадиях РШМ его уровень был почти в 2 раза ниже такового при CIN (*таблица 27*). Уровень IL-10 повышался в сыворотке пациентов при CIN (в 13 раз), местноограниченным (в 7 раз) и распространенном РШМ (в 3 раза) по сравнению с контрольной группой. Однако при прогрессировании РШМ его уровень был значимо ниже аналогичного показателя при CIN (*таблица 27*).

IFN γ был значимо повышен в сыворотке пациентов с CIN и РШМ по сравнению с контролем, что соотносится с данными при РЯ. В сыворотке больных РШМ на Ib-IIa и IIb-IV стадиях этот уровень был ниже такового у больных CIN (таблица 27).

Таблица 27 – Уровень противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови при CIN и раке шейки матки

Группа		Контроль, n=22	CIN, n=32	Стадии рака шейки матки		
				Ia, n=21	Ib-IIa, n=16	IIb-IV, n=13
Показатель (пг/мл)						
IL-4	Me (Q1- Q3)	1,249 (0,434- 1,998)	3,856 (2,021- 5,372)	2,561 (0- 10,000)	1,948 (1,194- 2,188)	2,345 (1,829- 3,625)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0023	p ₁ =0,0054 p ₂ =0,0014	p ₁ =0,0003 p ₂ =0,0252
IL-10	Me (Q1- Q3)	1,476 (1,275- 1,841)	13,897 (11,146- 31,460)	2,877 (0- 8,350)	7,464 (5,335- 9,575)	3,628 (2,510- 5,121)
	p		p ₁ =0,0001	p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0014 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0025 p ₂ =0,0007 p ₃ =0,0001
IFN γ	Me (Q1- Q3)	4,156 (2,087- 5,747)	12,414 (9,137- 16,209)	9,100 (1,270- 43,170)	5,109 (4,210- 6,864)	8,179 (4,644- 9,320)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0011	p ₁ =0,0579 p ₂ =0,0002 p ₃ =0,0237	p ₁ =0,0155 p ₂ =0,0205

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

Можно предполагать, что полученные данные свидетельствуют о существенном противовоспалительном цитокиновом статусе при CIN и его снижении при РШМ.

При оценке уровня хемокинов в сыворотке крови было выявлено повышение IL-8 на 39% и MCP-1 на 22% при CIN по сравнению с контролем, что, возможно, связано с усилением воспалительной реакции организма и

рекрутингом Нф. Уровень IL-8 значимо снижался Ib-IIa стадии РШМ по сравнению с CIN, а Pb-IV стадии РШМ - повышался по сравнению с контролем. Концентрация MCP-1 на Ia стадии РШМ значимо снижалась по сравнению с таковым уровнем при CIN. При прогрессировании РШМ в сыворотке крови увеличивался уровень MCP-1 (таблица 28). По полученным нами данным, на разных стадиях РШМ провоспалительный системный эффект поддерживают разные хемокины.

Таблица 28 – Уровень хемокинов в сыворотке крови при CIN и раке шейки матки

Группа		Контроль, n=22	CIN, n=32	Стадии рака шейки матки		
				Ia, n=21	Ib-IIa, n=16	Ib-IV, n=13
Показатель (пг/мл)						
IL-8	Me (Q1- Q3)	11,042 (10,300- 14,986)	18,931 (12,300- 22,692)	12,752 (8,014- 26,073)	10,392 (7,654- 13,687)	24,757 (13,441- 28,369)
	p		p ₁ =0,0135		p ₂ =0,0075 p ₃ =0,0266	p ₁ =0,0069 p ₃ =0,0074
MCP-1	Me (Q1- Q3)	270,098 (220,1479- 310,852)	344,680 (263,479- 418,292)	256,952 (252,578- 261,484)	385,200 (333,416- 429,453)	565,843 (472,941- 607,458)
	p		p ₁ =0,0076	p ₂ =0,0007	p ₁ =0,0001 p ₃ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0006

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с CIN; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

Также при изучении периферической крови пациентов с CIN было установлено, что уровень NE снижался по сравнению с контролем (p=0,0001) и оставался сниженным на начальных стадиях РШМ (p_{1,2}=0,0001). При распространенном РШМ уровень NE значимо возрастал по сравнению с аналогичными показателями при CIN (p=0,0001) и не отличался от контроля (p=0,6428) (рисунок 23).

Уровень VEGF в сыворотке крови значительно снижался по сравнению с контролем при CIN ($p=0,0580$) и на Ia стадии РШМ ($p=0,0396$). При местнораспространенном ($p=0,0001$) и распространенном процессе уровень VEGF в сыворотке крови значительно повышался по сравнению с контролем ($p=0,0009$) (рисунки 23).

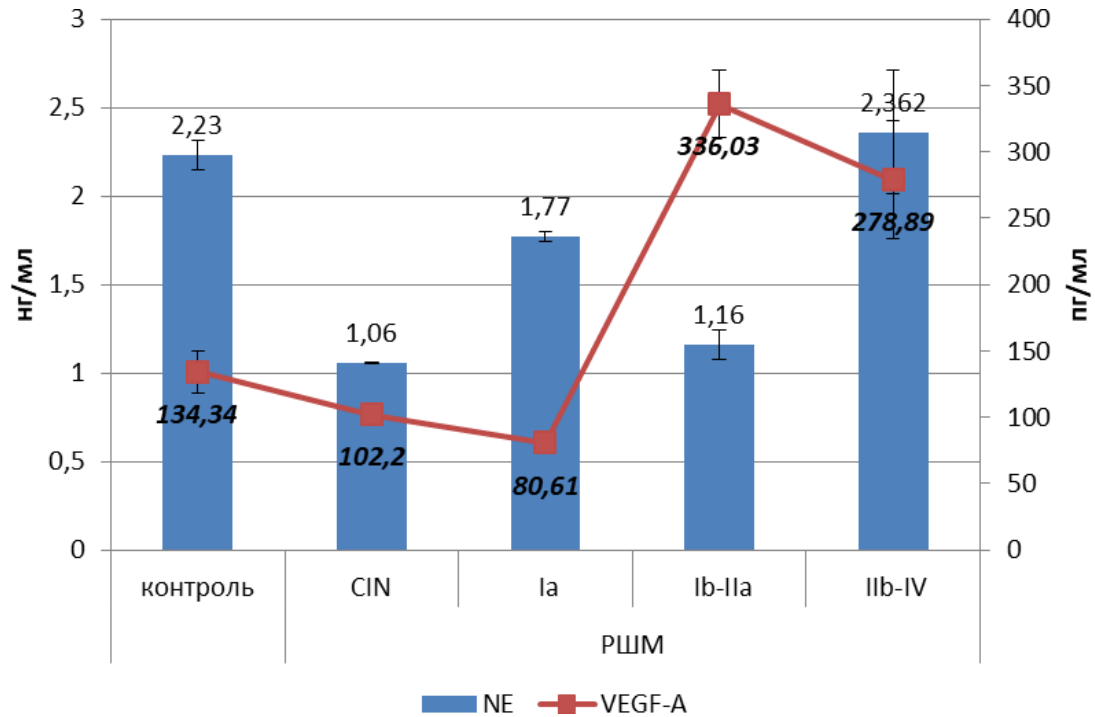


Рисунок 23 – Уровень васкулоэндотелиального фактора роста и нейтрофильной эластазы в сыворотке крови при CIN и прогрессировании рака шейки матки

Примечание: РШМ – рак шейки матки, CIN – цервикальная интраэпителиальная неоплазия, NE - нейтрофильная эластаза, VEGF-A - васкулоэндотелиальный фактор роста

Подобная динамика уровня VEGF и NE также наблюдалась на разных стадиях РЯ. Можно предполагать, что одновременное снижение при CIN уровней VEGF и NE способствуют снижению системной воспалительной реакции.

Удалось установить, что при CIN и РШМ в сыворотке повышался по сравнению с контролем уровень MMP-1 ($p_1=0,0001$, $p_2=0,0006$), MMP-2 ($p_1=0,0001$, $p_2=0,0001$) и TIMP-1 ($p_1=0,0002$, $p_2=0,0011$) и снижался уровень

MMP-13 ($p_1=0,0001$, $p_2=0,0032$). Изменение концентраций MMP-1, MMP-13 в сыворотке крови пациентов при CIN соотносится с данными при ДОЯ.

MMP-9 значительно повышался при РШМ по сравнению с аналогичными показателями в группе контроля ($p=0,0013$) и CIN ($p=0,0009$) (рисунок 24).

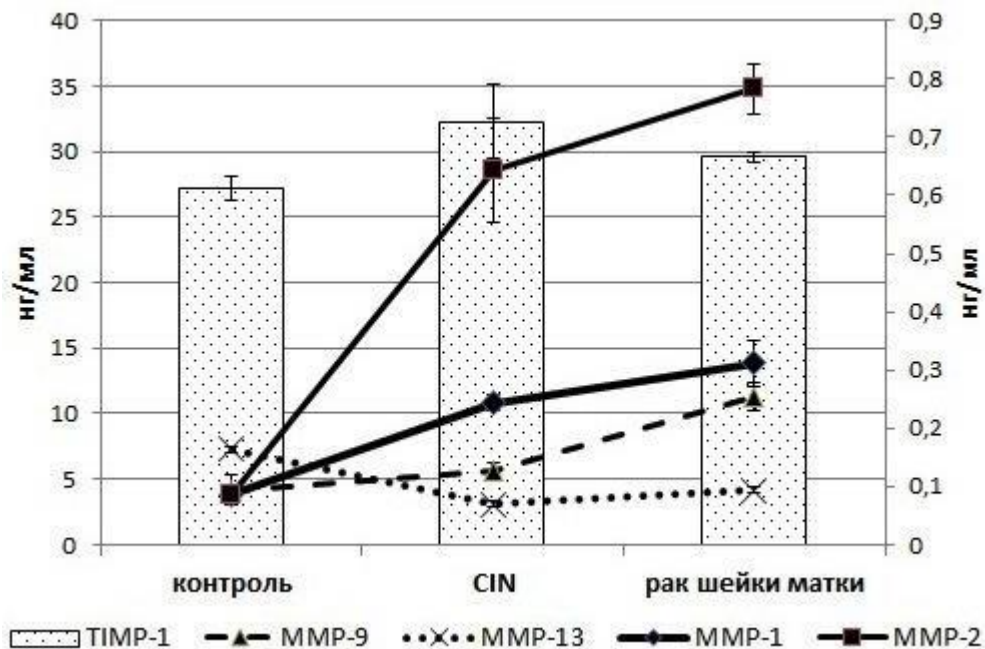


Рисунок 24 – Уровень матричных металлопротеиназ и тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы в сыворотке при CIN и раке шейки матки
Примечание: CIN - цервикальная интраэпителиальная неоплазия, MMP - матричная металлопротеиназа, TIMP - тканевый ингибитор матричных металлопротеиназ

Таким образом, изменение уровней изученных цитокинов определяет опухолеассоциированное воспаление, способствующее прогрессированию РШМ. CIN характеризуется повышенным уровнем циркулирующих в крови провоспалительных IL-1 β , IL-8, IL-18, MCP-1, MMP-1, MMP-2. На начальной стадии РШМ в сыворотке провоспалительный эффект усиливали IL-2, IL-6, IL-17A, NE. При местноограниченном и распространенном РШМ снижение противовоспалительных IFN γ , IL-10, а также увеличение VEGF, IL-2, TNF- α способствовало опухолеассоциированному воспалению.

4.6 - Маркеры дифференцировки на этапе первичной диагностики рака шейки матки и CIN

В унивариантном анализе логистической регрессии для дифференциальной диагностики между CIN и РШМ статистическую значимость совместно демонстрировали циркулирующие G-CSF (ОШ 0,79 95% ДИ 0,682-0,925, $p=0.003$), IL-2 (ОШ 1,996 95% ДИ 1,284-3,103, $p=0.002$) и IFN γ (ОШ 0,726 95% ДИ 0,565-0,934, $p=0.013$). Площадь под кривой (AUC) такой модели составила 0,982, и РШМ мог быть диагностирован с 96.2% вероятностью (Spec.=1.00, Sens.=0.962) (рисунок 25). Риск возникновения РШМ возрастал при сниженных уровнях G-CSF (менее 33,937 пг/мл) и IFN γ (менее 9,137 пг/мл), и одновременно повышенном в сыворотке крови уровне IL-2 (более 3,991 пг/мл) ($R^2=0,890$, $\chi^2=87,8$, $p=0,001$).

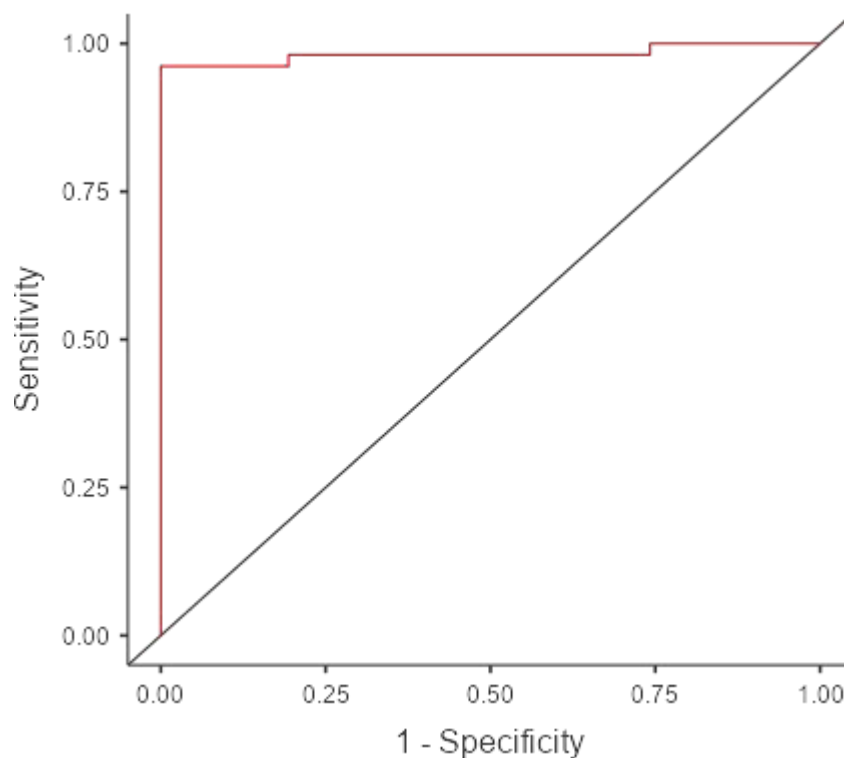


Рисунок 25 – ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики CIN и рака шейки матки с учетом показателей G-CSF, IL-2 и IFN γ сыворотки крови

В проведенном нами унивариантном анализе логистической регрессии для дифференциальной диагностики между CIN и РШМ статистическую

значимость совместно демонстрировали NE (ОШ 344.6177 95% ДИ 12.7478-9316.191, $p=0.001$), IL-8 (ОШ 0.9604 95% ДИ 0.9334-0.988, $p=0.005$) и ИЛ циркулирующих Нф (ОШ 0.0822 95% ДИ 0.0207-0.327, $p=0.001$). Площадь под кривой (AUC) такой модели составила 0,978, и РШМ мог быть диагностирован со 100% вероятностью (Spec.=0.968, Sens.=1.000) (рисунок 26).

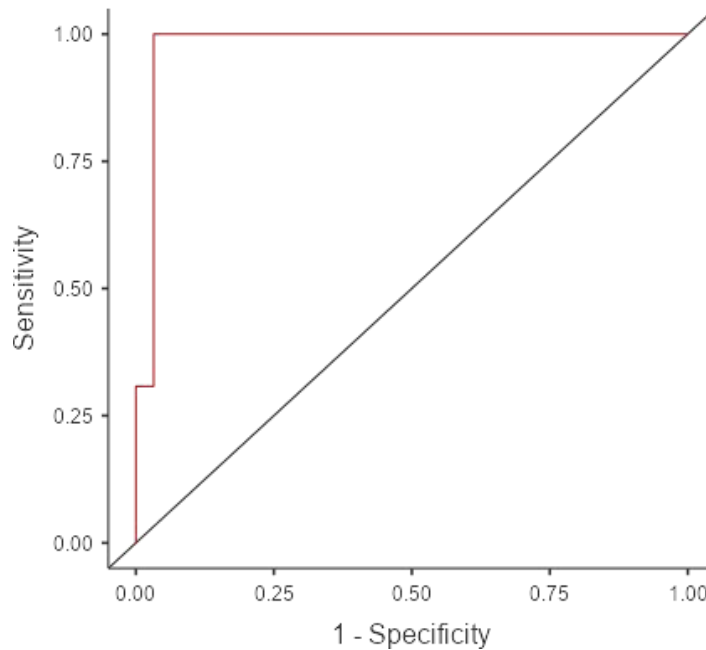


Рисунок 26 – ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики CIN и рака шейки матки с учетом показателей NE, IL-8 и индекса ловушек нейтрофилов

Риск возникновения РШМ возрастал при сниженных уровнях IL-8 (менее 108,694 пг/мл) и ИЛ (менее 1,8 у.е.), и одновременно повышенном уровне в Нф NE (более 0,817 нг/мл) ($R^2=0,880$, $\chi^2=86,0$, $p=0,001$).

Таким образом, маркерами при дифференциальной диагностике РШМ и CIN могут служить - G-CSF, IL-2 и IFN γ в сыворотке крови; также активность NE, IL-8 в Нф и ИЛ.

В результате проведенных исследований были получены патенты на изобретение:

- «Способ дифференциальной диагностики РШМ» (Патент на изобретение RU 2488823 С1, 27.07.2013), основанный на экспериментальном исследовании *in vitro*. Суспензию Нф периферической крови подвергали

фемтосекундному лазерному излучению в различных дозах и определяли в Нф активность МПО, кислой фосфатазы, уровень катионных белков и активность в НСТ-тесте. Способ позволяет определить стадию рака шейки матки.

- «Способ уточнения стадии распространенного рака шейки матки» (Патент на изобретение RU 2582979 С1, 27.04.2016), позволяющий проводить дифференциальную диагностику Ib-IIa или IIb-IV стадии РШМ у пациенток по уровню IL-1 β в плазме крови.

Таким образом, при CIN гранулоциты N1-фенотипа имели повышенную миелопероксидазную цитотоксичность и содержание IFN γ , TIMP-1, IL-2, IL-4, а N2-подобные Нф имели выраженный ангиогенный потенциал (VEGF, NE, MMP-1, MMP-2, MMP-9, IL-6, G-CSF) и способность к NET-образованию. На всех стадиях РШМ Нф с противоопухолевым фенотипом имели повышенный уровень МПО, TNF α , IL-2, TIMP-1, а проопухолевые Нф циркулировали со сниженной кислородзависимой цитотоксичностью, повышенным NETos, экспрессией NF-kB, VEGF, NE, IL-6, MMP-1, MMP-2, MMP-9.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ

4-Й ГЛАВЫ

Публикации в изданиях, рецензированных ВАК, и в международных реферативных базах данных Scopus и Web of Science

1. Абакумова, Т.В. Фемтосекундное лазерное излучение в модулировании неспецифического иммунитета на начальной стадии рака шейки матки / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, Д.Р. Долгова, С.С. Пирмамедова // Креативная хирургия и онкология. 2012. № 3. С.18-21 (РИНЦ - 0.299).

2. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови на различных клинических стадиях рака шейки матки / Т.В. Абакумова, С.О. Генинг, Д.Р. Арсланова, О.С. Воронова, Е.Г. Сидоренко, П.Г. Долгов // Вестник РГМУ. 2012. № 1, спец.вып. С.222-223 (РИНЦ - 0.499).

3. Цитоархитектоника и фагоцитарная активность нейтрофилов больных раком шейки матки при фемтосекундном лазерном излучении *in vitro* / Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, И.И. Антонеева, Д.Р. Арсланова, В.В. Светухин, С.О. Генинг // Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т.ХІХ, № 3. С.34-37 (РИНЦ - 0.151).

4. Neutrophils of the patients with cervical cancer after femtosecond laser radiation *in vitro* / T. Abakumova, A. Sysoliatin, I. Antoneeva, V. Svetukhin, D. Arslanova, S. Gening // Proc. SPIE. Biophotonics and Immune Responses VII. 2012. Vol.8224. doi: 10.1117/12.907288 (WoS).

5. Абакумова, Т.В. Модификация морфо-функционального состояния нейтрофилов в динамике рака шейки матки у женщин в репродуктивном периоде и в постменопаузе / Т.В.Абакумова, И.И. Антонеева, С.О.Генинг, Т.П.Генинг // Вопросы онкологии. 2013. Т.59, № 3, прил. С. 17 (РИНЦ - 0.271).

6. Секреторная активность нейтрофилов периферической крови на начальной стадии рака шейки матки / Т.В. Абакумова, С.О.Генинг, О.С. Воронова, И.И. Антонеева, С.С. Пирмамедова // Российский иммунологический журнал. 2013. Т. 7 (16), № 2-3. С.138 (РИНЦ - 0.671).

7. Синдром опухоль-ассоциированного вторичного иммунодефицита на различных клинических стадиях рака шейки матки / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, Т.П. Генинг, О.С. Воронова, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг // Российский аллергологический журнал. 2013. № 2. С.14-15 (РИНЦ - 0.349).

8. Абакумова, Т.В. Провоспалительные цитокины и фактор роста в сыворотке крови при прогрессировании рака шейки матки / Т.В. Абакумова, С.О. Генинг, Д.Р. Долгова, А.В. Фомина // Сибирский онкологический журнал. 2014. № 1, прил. С.37 (РИНЦ - 0.698).

9. Динамика уровня провоспалительных цитокинов и их роль в развитии локальных и системных эффектов при прогрессировании рака шейки матки / Т.П. Генинг, Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, А.Б. Песков, Е.Г. Сидоренко, С.О. Генинг, Д.Р. Долгова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т.157, № 6. С.748-752. DOI 10.1007/s10517-014-2665-z (РИНЦ - 0.932, Scopus, WoS).

10. Цитокиновый профиль и метаболическая активность нейтрофилов периферической крови при прогрессировании неоплазмы / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, Т.П. Генинг, С.О. Генинг, Д.Р. Долгова, А.В. Фомина // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2014. № 4. С.86-90 (РИНЦ - 0.466, Scopus).

11. Цитокиновый статус и фенотип нейтрофилов при прогрессировании рака шейки матки / Т.П. Генинг, Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, С.О. Генинг, А.Б. Песков, Д.Р. Долгова // Вопросы онкологии. 2014. Т.60, № 5. С.584-589 (РИНЦ - 0.271, Scopus).

12. Абакумова, Т.В. Уровень VEGF-A в сыворотке и нейтрофилах при прогрессировании цервикальной интраэпителиальной неоплазии / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, Т.П. Генинг, Д.Р. Долгова // Успехи молекулярной онкологии. 2019. Т.6, №S4. С.61 (РИНЦ - 0.535)

13. Фенотип циркулирующих нейтрофилов на разных стадиях неоплазии шейки матки / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, С.О. Генинг, Д.Р. Долгова, А.Б. Песков, Т.П. Генинг // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 6. С. 1127-1138. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138 (РИНЦ - 0.740, Scopus).

14. Pro-oncogenic status of circulating neutrophils in cervical intraepithelial neoplasia /T. Abakumova, S. Gening, T. Gening // Annals of Oncology. 2020. Vol. 31, suppl_5. S1217-S1239. doi: 10.1016/annonc/annonc321 (WoS).

15. Extracellular traps of the circulating neutrophils in CIN and cervical cancer /T. Abakumova, I. Antoneeva, S. Gening, A. Peskov, T. Gening // Annals of Oncology. 2021. Vol. 32, suppl_5. S725-S772. doi 10.1016/annonc/annonc703 (WoS).

Патенты:

16. Способ дифференциальной диагностики рака шейки матки / Т.П. Генинг, С.О. Генинг, Т.В. Абакумова, Д.Р. Арсланова, И.И. Антонеева, Л.Г. Рябова, Е.Г. Сидоренко // Патент на изобретение RU 2488823 С1, 27.07.2013. Заявка № 2012107983/15 от 01.03.2012.

17. Способ уточнения стадии распространенного рака шейки матки / Т.П. Генинг, Т.В. Абакумова, Д.Р. Долгова, И.И. Антонеева, С.О. Генинг, А.А. Михеенко, А.В. Фомина, Л.Г. Комарова, И.А.Корчагина, А.Ю. Тузеева // Патент на изобретение RU 2582979 С1, 27.04.2016. Заявка № 2015109694/15 от 19.03.2015.

Монографии:

18. Успехи и проблемы современной онкологии: монография / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, В.Ю. Барштейн, Т.П. Генинг, Е.А. Гревцева, Т.А. Круподёрова, Т.Л. Настаушева, Е.А. Рябова, Е.В. Шумейко, Н.В. Шумейко, Н.Б. Юдина, В.П. Волков. Новосибирск: Ассоциация научных сотрудников "Сибирская академическая книга", 2014. 108 с. ISBN: 978-5-4379-0383-4.

19. Абакумова, Т.В. Неспецифический иммунитет при онкогинекологической патологии: монография. Ульяновск: Ульянов. гос. ун-т, 2018. 112с. ISBN: 978-5-88866-688-3.

20. Атомно-силовая микроскопия в биомолекулярной аналитике: монография / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, М.Н. Артамонова, Р.И. Бахтияров, Д.Р. Долгова, Е.С.Махмутова, Б.Б. Костишко, И.Б. Костишко, И.С. Немова, А.С. Нестеров, А.В. Нестерова, Н.И. Потатуркина-Нестерова, А.С. Хитрова, О.В. Столбовская, А.Ю. Федотова, Р.М. Хайруллин. Ульяновск: Ульянов. гос. ун-т, 2018. 122 с. ISBN: 978-5-88866-749-1.

Публикации в других изданиях:

21. Абакумова, Т.В. Морфофункциональное состояние нейтрофильных лейкоцитов в динамике рака шейки матки / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева // Экологическая физиология и медицина: наука, образование, здоровье населения: материалы Всероссийской конференции с международным участием (12-14 сентября 2012г., г.Ульяновск). Ульяновск, 2012. С.3-5.

22. *Абакумова, Т.В.* Неспецифический клеточный иммунитет на разных стадиях рака шейки матки / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева // Ульяновский медико-биологический журнал. 2012. № 2. С.104-110.

23. Оценка микробицидной активности нейтрофилов крови больных раком шейки матки / *Т.В. Абакумова, Д.Р.Арсланова, С.О. Генинг, Е.Г. Сидоренко, О.С. Воронова, Т.П. Генинг* // Западские чтения: сборник материалов VII научно-практической конференции молодых ученых с международным участием (24.03.2012г., Ростов-на-Дону). Ростов-на-Дону, 2012. С.35-36.

24. Роль цитокинов в развитии полимодальных локальных и дистантных эффектов при прогрессировании рака шейки матки / *Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, И.И. Антонеева, Е.Г. Сидоренко, С.О. Генинг, Д.Р. Долгова* // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: сборник статей международной конференции (Пушино, 27-30 мая 2013). Пушино, 2013. С.519-523.

ГЛАВА 5 – СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ МИОМЕ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА ТЕЛА МАТКИ

С использованием цитохимических, иммуноферментных методов исследования, атомно-силовой и флуоресцентной микроскопии было оценено количество и морфо-функциональное состояние Нф при миоме матки и на разных стадиях рака тела матки (РТМ).

5.1 – Оценка нейтрофильно-лимфоцитарного отношения, ригидности мембраны и экспрессии дифференцировочных антигенов нейтрофилов в периферической крови пациентов при миоме и на разных стадиях рака тела матки

В результате проведенного нами исследование периферической крови пациентов с миомой матки и РТМ выявлено, что абсолютное количество Le и NLR значительно не изменяются (рисунок 27).

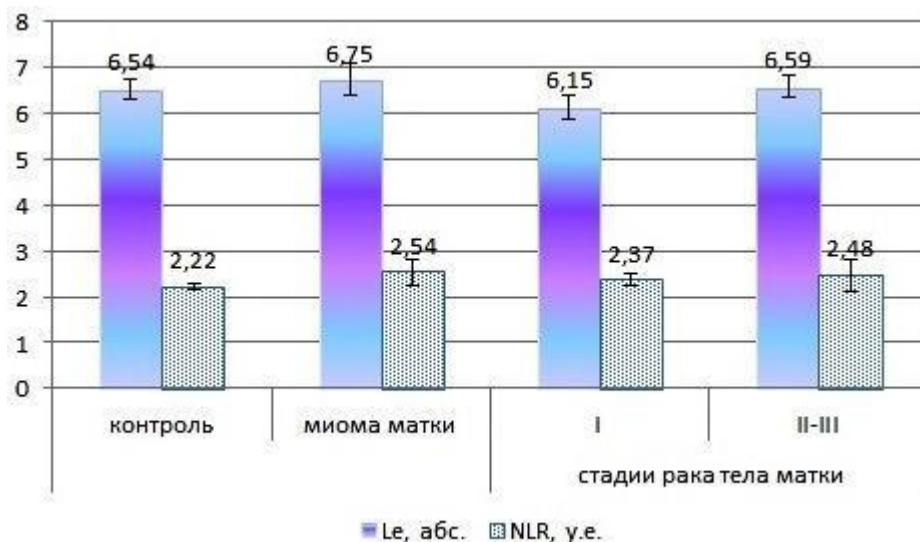


Рисунок 27 – Общее количество лейкоцитов и NLR у пациентов с миомой и на различных стадиях рака тела матки

Примечание: РТМ - рак тела матки, Le - лейкоциты, NLR - нейтрофильно-лимфоцитарное отношение

При оценке фенотипического разнообразия Нф периферической крови было выявлено увеличение количества CD11b⁺Нф при миоме и на II-III стадии РТМ по сравнению с контрольной группой. Количество CD11b⁺Нф было ниже на I стадии РТМ по сравнению с миомой матки (таблица 29). Помимо этого, при оценке фенотипа Нф циркулирующей крови было обнаружено снижение количества CD16⁺Нф на начальной стадии РТМ по сравнению с миомой. Значимое повышение количества CD63⁺Нф наблюдалось при миоме. При РТМ количество CD63⁺Нф находилось в пределах коридора нормы, но значительно ниже по сравнению с аналогичными показателями при миоме (таблица 29). Количество CD95⁺Нф снижалось на стадии II-III РТМ по сравнению группой при миоме и контроля (таблица 29).

Таблица 29 – Количество нейтрофилов с различным фенотипом при миоме и на различных стадиях рака тела матки (M±m)

Группа Показатель	Контроль, n=22	Миома матки, n=20	Стадии рака тела матки	
			I, n=42	II-III, n=16
CD11b ⁺ , %	60,40±7,76	94,77±0,43	74,61±7,63	92,00±0,74
p		p ₁ =0,0019	p ₂ =0,0054	p ₁ =0,0024
CD16 ⁺ , %	98,90±0,74	98,66±0,45	94,50±1,69	97,32±0,57
p			p ₂ =0,0299	
CD63 ⁺ , %	34,90±7,38	76,77±8,96	55,32±6,96	46,76±6,00
p		p ₁ =0,0024	p ₂ =0,0088	p ₂ =0,0029
CD95 ⁺ , %	38,54±6,18	48,52±4,98	56,61±7,92	20,92±1,55
p				p ₁ =0,0058 p ₂ =0,0029 p ₃ =0,0057

Примечание: p₁- данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

Нами установлено снижение модуля Юнга при миоме по сравнению с контролем (p=0,0214). Снижение показателя ригидности нативных Нф пациенток при РТМ наблюдалось на начальной стадии по сравнению с Нф контрольной группы (37,31±2,24 МПа против 56,70±2,40 МПа в контроле, p=0,0512), что свидетельствует о снижении эластичности и вязкости

клеточной мембраны и повышении жесткости мембраны Нф пациентов при РТМ. На II-III стадии РТМ ригидность мембраны Нф повышалась до $70,46 \pm 8,41$ МПа ($p=0,0314$).

Полученные данные позволяют утверждать, что Нф пациентов при РТМ начальной стадии характеризуются утратой овальной формы, появлением выростов, набуханием без внесения в среду стимулирующих агентов, свидетельствующем об активации калиевых каналов (рисунок 28), отсутствием четкого изображения ядра и невозможностью дифференцировать гранулы цитоплазмы.

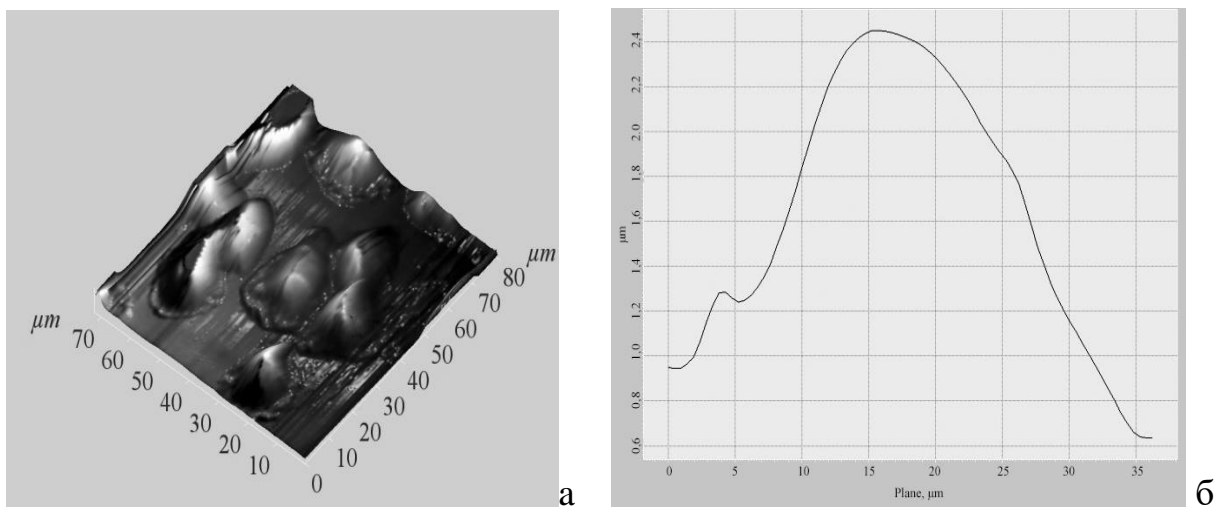


Рисунок 28 – Нейтрофилы пациентки с раком тела матки Ia стадии (результат сканирования в жидкой среде в 3D (а), боковое сечение профиля клетки (б))

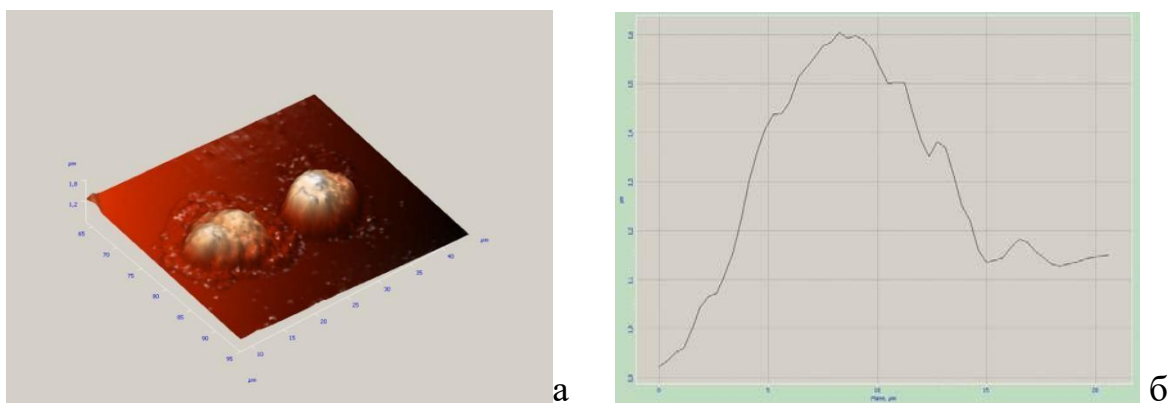


Рисунок 29 – Нейтрофилы пациентки с раком тела матки II стадии при фиксации метанолом (результат сканирования в 3D (а), боковое сечение профиля клетки (б))

При сканировании Нф пациентов с распространенным РТМ было видно, что клетка распластана на подложке, границы клетки чётко видны, в цитоплазме дифференцируются гранулы (рисунки 28, 29).

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать наличие изменения ригидности мембраны Нф при РТМ. Количество циркулирующих CD11b⁺Нф повышалось уже при миоме матки. При распространенном РТМ снижалось количество CD63⁺, CD95⁺Нф. Это может быть связано с тем, что эластичность мембраны Нф повышалась совместно с ее адгезионными свойствами, необходимыми для лучшего проникновения через сосудистую стенку и миграции к опухоли.

5.2 – Показатели кислородзависимого киллинга нейтрофилов периферической крови пациентов с миомой и раком тела матки

В результате проведенного исследования выявлено статистически значимое повышение ФИ при миоме, однако, ФЧ снижалось, и фагоцитоз шел по незавершенному типу (ИЗФ менее 1) (таблица 30). На начальной стадии РТМ фагоцитоз шел по завершенному типу (ИЗФ более 1). При распространенном РТМ ФИ значимо снижался по сравнению с аналогичными показателями в группе с миомой.

Таблица 30 – Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов при миоме и прогрессировании рака тела матки (M±m)

Группы Показатели	Контроль, n=22	Миома матки, n=20	Стадии рака тела матки	
			I, n=42	II-III, n=16
ФИ, %	41,20±6,44	56,00±8,58*	45,09±4,19	39,37±9,59`
ФЧ, у.е.	1,97±0,17	1,46±0,13*	2,12±0,11	1,80±0,13
ИЗФ, у.е.	1,04±0,14	0,68±0,09	1,12±0,08	0,96±0,04

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; ` - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки ($p \leq 0,05$), ИЗФ - индекс завершенного фагоцитоза, ФИ - фагоцитарный индекс, ФЧ - фагоцитарное число.

Однако при миоме матки в Нф повышалась уровень МПО ($p=0,0076$) и значимо снижалась активность Нф в индуцированном НСТ-тесте (рисунк 30). Уровень МПО оставался повышенным на разных стадиях РТМ, но при распространенном процессе значимо снижалась по сравнению с таковым при миоме матки ($p=0,0076$). Также на стадии II-III РТМ активность Нф была ниже таковой в контроле в индуцированном НСТ-тесте ($p_1=0,0109$ и $p_2=0,0077$) (рисунк 30).

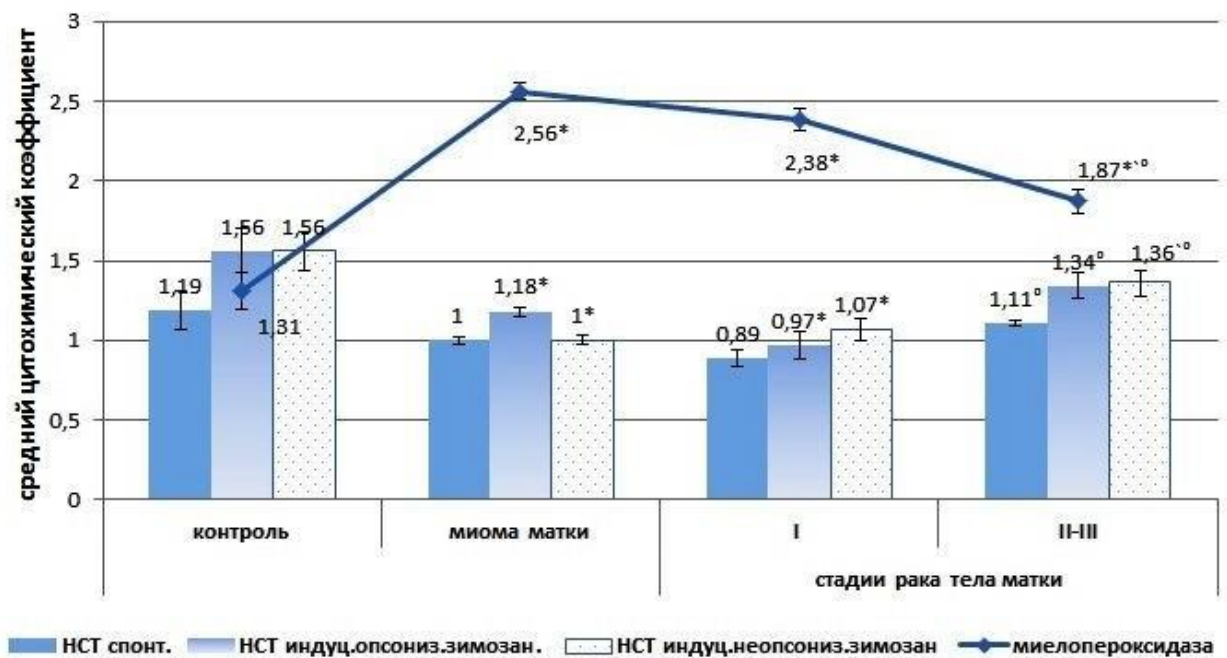


Рисунок 30 – Активность миелопероксидазы и показатели НСТ-теста нейтрофилов при миоме и на разных стадиях рака тела матки

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; ` - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; ° - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии ($p \leq 0,05$).

Таким образом, при миоме при увеличении количества Нф способных к фагоцитозу и повышенной продукции МПО, макрофаги не способны к завершённому фагоцитозу. При прогрессировании РТМ повышалась способность к завершённому фагоцитозу и способность продуцировать АФК, однако уровень МПО снижался. Изменение оцениваемых параметров при миоме и при нераспространённым РТМ соотносятся с данными при ДОЯ и РЯ

I-II стадии. Это может обуславливать миелопероксидазную цитотоксичность при миоме и нераспространенном РТМ, что вызывает рост атипичных клеток.

5.3 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки при миоме и на разных стадиях рака тела матки

В результате проведенных нами исследований установлено значимое возрастание ЧЛ ($p=0,0002$) и ИЛ ($p=0,0155$), образованных Нф пациентов с миомой по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы (рисунок 31).

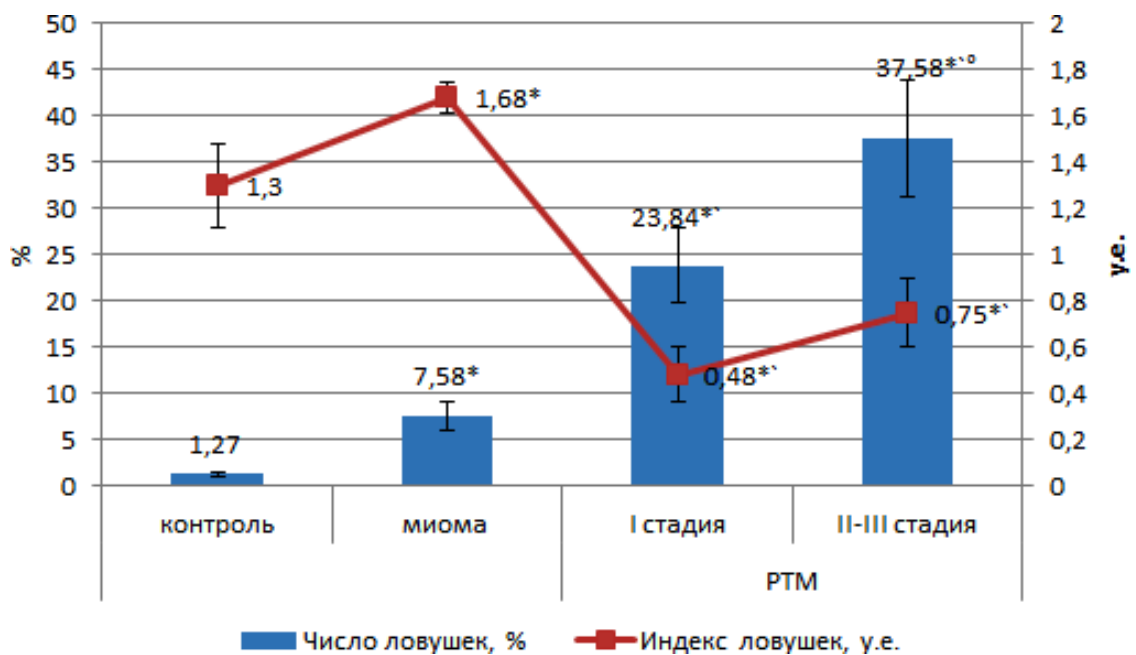


Рисунок 31 – Показатели NETs при миоме и прогрессировании рака тела матки

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; ` - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; ° - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии ($p \leq 0,05$).

При РТМ на начальной стадии ЧЛ был отмечен значительный рост ($p=0,0031$) и продолжение этого роста при распространенном РТМ ($p=0,0001$) по сравнению с таковым в группе с миомой. При этом ИЛ значимо снижался при РТМ по сравнению с аналогичным показателем в группе с миомой ($p=0,0001$) (рисунок 31, 32).

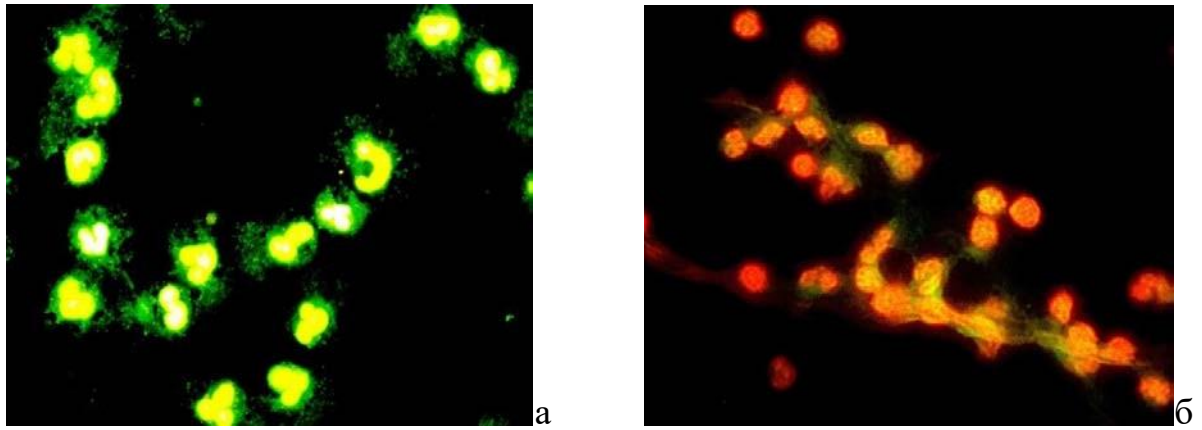


Рисунок 32 – Нейтрофилы пациентов при раке тела матки, окрашенные акридиновым оранжевым, (а) - нейтрофилы с сегментированным ядром и с недифференцированным ядром, б - NET, микрофото, × 1000

Таким образом, при миоме возрастала способность Нф к захвату клеток с помощью NETs. На начальной стадии РТМ у Нф увеличивалась способность образовывать ловушки, но количество захваченных частиц резко снижалась. Аналогичная динамика ИЛ наблюдалась при ДОЯ и I-II стадии РЯ. При прогрессировании РТМ способность Нф образовывать NETs увеличивалась, но количество захваченных клеток было сниженным. Повышенная способность к NETos и сниженная киллинговая функция NET может способствовать миграции опухолевых клеток в комплексе «нейтрофил-опухолевая клетка».

5.4 – Уровень про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, NF-κB, нейтрофильной эластазы, васкулоэндотелиального фактора, матриксных металлопротеиназ в лизате нейтрофилов пациентов при миоме и раке тела матки

Анализ полученных данных показал повышение IL-1β в 7 раз в Нф при миоме матки и в 5 раз на разных стадиях РТМ по сравнению с контролем (таблица 31). Концентрация IL-1RA в лизате Нф в 67 раз снижалась при миоме матки. На начальной стадии РМТ уровень IL-1RA в лизате Нф был в 1,7 раз выше такового в контрольной группе и в 120 раз при миоме. При распространенном РТМ уровень IL-1RA в лизате Нф снижался в 28 раз по

сравнению с начальной стадией РТМ, но был в 4 раза выше такового при миоме (таблица 31).

Таблица 31 – Уровень цитокинов семейства IL-1, IL-17A, G-CSF в лизате циркулирующих нейтрофилов при миоме и на разных стадиях рака тела матки

Показатель (пг/мл)		Группа	Контроль, n=22	Миома, n=20	Стадии рака тела матки	
					I стадия, n=42	II-III стадия, n=16
IL-1 β	Me (Q1-Q3)		8,941 (3,764-15,659)	70,446 (52,302-94,236)	42,031 (27,504-68,354)	48,139 (41,558-56,037)
	p			p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0005	p ₁ =0,0004
IL-1RA	Me (Q1-Q3)		1681,276 (892,491-2983,449)	24,935 (22,551-30,500)	3000,000 (2167,783-3000,000)	104,688 (34,165-1114,329)
	p			p ₁ =0,0006	p ₁ =0,0156 p ₂ =0,0001	p ₂ =0,0290, p ₃ =0,0003
IL-17A	Me (Q1-Q3)		45,296 (39,776-54,765)	15,928 (11,125-20,361)	14,589 (13,442-16,184)	10,036 (9,913-10,371)
	p			p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001, p ₂ =0,0057, p ₃ =0,0001
IL-18	Me (Q1-Q3)		37,345 (18,492-55,863)	5,210 (4,365-7,319)	11,677 (5,984-25,697)	8,113 (6,547-12,256)
	p			p ₁ =0,0039	p ₁ =0,0021 p ₂ =0,0534	p ₁ =0,0019
G-CSF	Me (Q1-Q3)		0,125 (0,057-0,141)	0,490 (0,322-0,673)	35,346 (24,577-49,593)	25,986 (15,753-34,926)
	p			p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001, p ₂ =0,0001, p ₃ =0,0141

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

Повышенный уровень IL-1 β в миоме может быть обусловлен сниженным уровнем IL-1RA в Нф. Подобная динамика наблюдалась и при CIN.IL-17A в

лизате Нф при миоме матки снижался в 3 раза и продолжал снижаться при прогрессировании РТМ по сравнению с аналогичным уровнем в группе контроля и при миоме (*таблица 31*). Аналогичная динамика IL-17A в лизате Нф прослеживается при ДОЯ и при прогрессировании РЯ.

Уровень IL-18 в лизате Нф при миоме в 7 раз и на разных стадиях РТМ (в 3 и 4 раза) был ниже такого в группе контроля. Это соотносится с данными при РЯ и РШМ. Однако на начальной стадии РТМ уровень IL-18 в лизате Нф значительно повышался относительно аналогичного показателя в группе с миомой и значительно не изменялся при распространенном РТМ (*таблица 31*).

Уровень G-CSF в лизате Нф при миоме и РТМ был значительно выше по сравнению с контрольной группой. Подобные изменения G-CSF в лизате Нф были при ДОЯ и РЯ. На начальной стадии РТМ уровень G-CSF в лизате Нф повышался в 80 раз по сравнению с группой пациентов при миомах. На II-III стадиях РТМ уровень G-CSF в лизате Нф снижался по сравнению с начальной стадией, но был выше относительно аналогичных показателей в группе с миомами в 40 раз (*таблица 31*).

Повышение по сравнению с контролем уровня IL-2 в лизате Нф наблюдалось, как при миоме матки (в 3 раза), так и при РТМ (в 10 раз) (*таблица 32*). Повышенный IL-2, вероятно, инициирует транскрипцию генов-мишеней по JAK/STAT, PI3K/AKT и MAPK сигнальным путям. Посредством этих сигнальных путей IL-2 влияет на активацию и выработку цитокинов в Нф.

В результате проведенного нами исследования выявлено повышение уровня IL-6 в лизате Нф в 10 раз при миоме матки и на разных стадиях РТМ. На начальной стадии РТМ уровень IL-6 в лизате Нф был выше такового при миоме, и снова снижался при распространенном РТМ, достигая уровень при миоме (*таблица 32*). Возможно, что повышенный IL-6 активирует сигнальные пути Janus-киназы (JAK) и STAT3 в Нф, что усиливает их проопухолевые свойства.

Уровень TNF α в лизате Нф при был значительно ниже при РТМ по сравнению с аналогичными показателями в контроле (*таблица 32*).

Полученные данные концентрации TNF α в Нф не соотносятся с аналогичными данными при РЯ и РШМ. Вероятно, снижение секреции воспалительной молекулы TNF α в Нф ассоциировано со сниженной способностью генерировать АФК.

Таблица 32 – Провоспалительные цитокины в лизате циркулирующих нейтрофилов при миоме и на разных стадиях рака тела матки

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	Миома, n=20	Стадии рака тела матки	
				I стадия, n=42	II-III стадия, n=16
IL-2	Me (Q1- Q3)	3,907 (3,423- 4,359)	9,435 (8,157- 10,001)	13,941 (5,744- 19,992)	15,504 (5,521- 22,911)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0002	p ₁ =0,0003
IL-6	Me (Q1- Q3)	1,329 (0,992- 1,993)	10,633 (10,224- 11,551)	14,528 (13,130- 16,214)	11,191 (10,351- 12,070)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0007	p ₁ =0,0001 p ₃ =0,0001
TNF α	Me (Q1- Q3)	2,370 (1,128- 3,163)	1,457 (1,454- 1,838)	1,620 (1,126- 1,985)	1,383 (1,325- 1,593)
	p			p ₁ =0,0298	p ₁ =0,0144

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

Нами было выявлено повышение в 4 раза уровня IL-4 и снижение в 21 раз IL-10 в лизате Нф при миоме и на разных стадиях РТМ по сравнению с контролем (таблица 33). Уровень IFN γ в лизате Нф при миоме матки повышается в 15 раз по сравнению с контролем. На начальной стадии РТМ его уровень снижался до уровня в контроле, и снова повышался при распространенном процессе, однако оставался ниже такового при миоме (таблица 33). Динамика активности IFN γ в Нф при миоме и РТМ соотносится с данными при CIN и РШМ. Изменение уровней IL-4 и IL-10 при миоме соотносится с изменением аналогичных данных при ДОЯ. Сниженный по

сравнению с контролем уровень IL-10 в Нф на разных стадиях РТМ также наблюдался на разных стадиях РЯ. Снижение уровня противоопухолевых цитокинов в Нф при начальном РТМ, вероятно, усиливал проопухолевую функцию Нф.

Таблица 33 – Уровень противовоспалительных цитокинов в лизате циркулирующих нейтрофилов при миоме и на разных стадиях рака тела матки

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	Миома, n=20	Стадии рака тела матки	
				I стадия, n=42	II-III стадия, n=16
IL-4	Me (Q1- Q3)	1,457 (0,591- 2,069)	4,983 (4,692- 5,793)	2,080 (1,152- 4,998)	4,338 (1,117-5,367)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0047	p ₁ =0,0023
IL-10	Me (Q1- Q3)	63,961 (48,981- 88,843)	2,942 (1,938- 3,943)	3,988 (2,937- 5,384)	2,998 (2,095-5,643)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001
IFN γ	Me (Q1- Q3)	2,517 (1,661- 3,664)	31,004 (28,057- 35,338)	3,635 (1,414- 4,412)	11,625 (10,177- 11,790)
	p		p ₁ =0,0001	p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0001

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

При оценке уровня IL-8 в лизате Нф было выявлено снижение в 2,5 раза при миоме и на разных стадиях РТМ относительно группы контроля (таблица 34). Однако при РТМ уровень IL-8 в лизате Нф был в 2 раза ниже такового при миоме (таблица 34). Уровень MCP-1 в лизате Нф был на 35% выше при РТМ относительно группы с миомами и группы контроля (таблица 34). Аналогичные изменения MCP-1 в Нф относительно данных в группе контроля

наблюдались и при РЯ. Возможно, что Нф, продуцируя больше МСР-1, потенциально усиливали развитие адаптивных реакций Th1.

Таблица 34 – Уровень хемокинов в лизате нейтрофилов при миоме и на разных стадиях рака тела матки

Группа		Контроль, n=22	Миома, n=20	Стадии рака тела матки	
				I стадия, n=42	II-III стадия, n=16
Показатель (пг/мл)					
IL-8	Me (Q1-Q3)	158,826 (140,048-186,034)	63,619 (36,934-69,885)	27,341 (23,560-30,687)	25,141 (22,051-27,692)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0008
МСР-1	Me (Q1-Q3)	17,217 (14,029-19,561)	16,797 (12,904-20,151)	23,898 (20,147-28,825)	22,295 (20,754-23,763)
	p			p ₁ =0,0028 p ₂ =0,0027	p ₁ =0,0394 p ₂ =0,0012

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии

В результате проведенного нами исследования было выявлено повышение экспрессии NF-κB в ядерной фракции Нф в 3 раза при миоме и на всех стадиях РТМ по сравнению с контролем. Аналогичная динамика наблюдалась при CIN и РШМ. При этом экспрессия NF-κB при распространенном РТМ была в 1,4 раза выше таковой при миоме и в 1,7 раза при начальном РТМ (таблица 35).

Уровень VEGF в лизате Нф при миоме и на начальной стадии РТМ повышался в 1,7 раза по сравнению с контрольной группой. На II-III стадии РТМ уровень VEGF в лизате Нф повышался в 2,5 раза относительно такового в группе с миомой и начальной стадией (таблица 35). Повышенный уровень VEGF в лизате Нф выявлялся при всех исследуемых патологиях женской репродуктивной системы.

Активность NE в лизате Нф значительно повышалась при миоме в 2 раза и снижалась при РТМ, находясь в пределах коридора нормы (таблица 35). Это соотносится с данными при ДОЯ и начальной стадией РЯ.

Таблица 35 – Уровень ядерного фактора-кВ, васкулоэндотелиального фактора и нейтрофильной эластазы в лизате нейтрофилов крови при миоме и прогрессировании рака тела матки

Группа Параметр		Контроль, n=22	Миома, n=20	Стадии рака тела матки	
				I стадия, n=42	II-III стадия, n=16
NF-кВ, мг/мл	Me (Q1- Q3)	0,174 (0,125- 0,201)	0,503 (0,482- 0,533)	0,413 (0,358- 0,599)	0,700 (0,659- 0,714)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001, p ₂ =0,0001, p ₃ =0,0059
VEGF, пг/мл	Me (Q1- Q3)	48,940 (40,989- 52,851)	91,358 (78,670- 103,759)	78,387 (62,412- 92,856)	235,743 (223,478- 239,756)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0004	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0001
NE, нг/мл	Me (Q1- Q3)	0,361 (0,264- 0,412)	0,602 (0,392- 1,052)	0,334 (0,232- 0,432)	0,275 (0,217- 0,318)
	p		p ₁ =0,0017	p ₂ =0,0121	p ₂ =0,0023

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

В результате проведенных исследований было выявлено снижение уровня MMP-2 в лизате Нф при РТМ относительно такого при миоме (p=0,0453). Уровень MMP-9 в лизате Нф значительно повышался при миоме (p=0,0001) и РТМ (p=0,0023) по сравнению с контролем, а при РТМ его уровень был ниже такого при миоме (p=0,0008). При миоме (p=0,0019) и РТМ (p=0,0249) отмечалось снижение MMP-13 в нейтрофильных гранулоцитах. Уровни MMP-1 и TIMP-1 в Нф при миоме и РТМ находились в пределах коридора нормы (рисунок 33).

Полученные данные не соотносятся с данными MMPs и TIMP-1 в сыворотке при РЯ и РШМ.

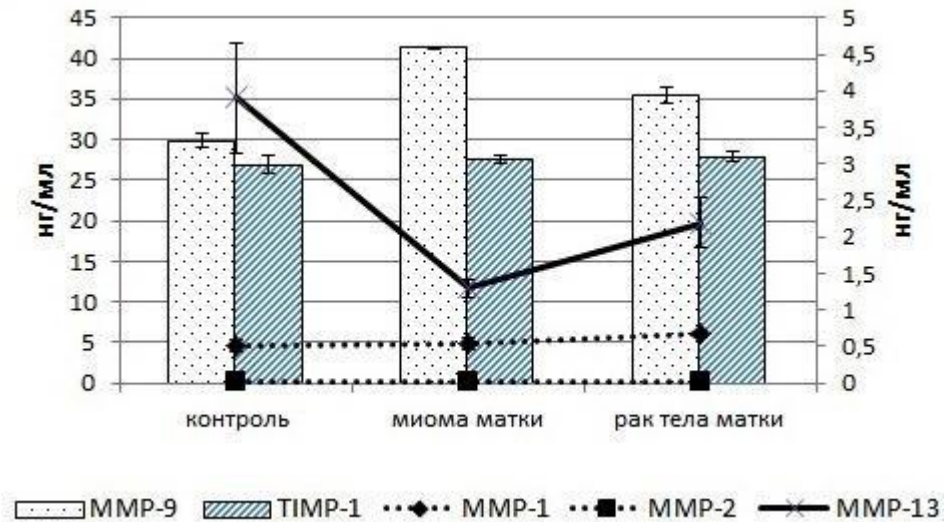


Рисунок 33 – Уровень матриксных металлопротеиназ и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы в нейтрофилах при миоме и раке тела матки
Примечание: MMP - матриксная металлопротеиназа, TIMP - тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы.

Таким образом, в лизате Нф при миоме повышался уровень NE, G-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IFN γ , MMP-9 и снижался уровень IL-1RA, IL-8, IL-10, IL-17A, IL-18, MMP-13. На начальной стадии РТМ в лизате Нф повышались IL-1RA, IL-6, IL-18, G-CSF, MCP-1 и снижались IFN γ , IL-8, NE по сравнению с миомой. При распространенном процессе в лизате Нф повышался уровень MCP-1, G-CSF, IL-1RA и снижался NE, IL-8, IL-17A, IFN γ по сравнению с аналогичными показателями при миоме. Экспрессия NF-kB и VEGF повышалась при миоме и при прогрессировании РТМ.

5.5 – Уровень цитокинов, васкулоэндотелиального фактора, нейтрофильной эластазы и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови пациентов с миомой и раком тела матки

Выявленное повышение IL-1 β в сыворотке при миоме в 8,7 раз и неизменный уровень IL-1RA может быть причиной воспаления. Однако при РТМ уровень IL-1 β был в 2 раза ниже такового при миоме, а IL-1RA - в 2,6 раз на I стадии РТМ и в 4 раза на II-III стадии РТМ выше такового при миоме, что свидетельствовало о блокировании воспалительного эффекта (*таблица 36*).

Уровень IL-2 в сыворотке был повышен при миоме и на начальной стадии РТМ на 20% по сравнению с аналогичными показателями в группе контроля, что, возможно влияет на активацию рецепторов адгезии на поверхности Нф. При распространенном РТМ его уровень на 15% ниже, чем при миоме (*таблица 36*). Повышение IL-2 на I стадии РТМ соотносится с аналогичными данными при РЯ I-II и РШМ Ia стадии.

Повышение IL-6 в сыворотке пациентов на начальной стадии РТМ было в 1,8 раза относительно такового при миоме, что способствовало увеличению системной воспалительной реакции, ангиогенезу и прогрессированию опухоли и метастазирование. Но при распространенном процессе его уровень значительно снижался до аналогичных показателей в контроле (*таблица 36*). Это соотносится с данными при начальном и местноограниченном РШМ.

Уровень IL-17A в сыворотке крови пациентов с миомой и РТМ был значительно ниже такового в контроле, а уровень IL-18 находился в пределах коридора нормы (*таблица 36*). Это не соотносится с аналогичными показателями при прогрессировании РШМ, ДОЯ и РЯ.

Таблица 36 – Уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови при миоме и раке тела матки

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	Миома, n=20	Стадии рака тела матки	
				I стадия, n=42	II-III стадия, n=16
IL-1 β	Me (Q1- Q3)	1,811 (1,582- 2,182)	15,816 (8,053- 20,173)	5,912 (3,172- 12,160)	7,559 (5,584-9,452)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0011	p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0005
IL-1RA	Me (Q1- Q3)	200,209 (179,882- 266,188)	231,803 (209,996- 284,218)	601,777 (496,398- 789,332)	999,284 (525,260- 1240,463)
	p			p ₁ =0,0001 p ₂ =0,0002	p ₁ =0,0007, p ₂ =0,0072, p ₃ =0,0079
IL-2	Me (Q1- Q3)	2,531 (1,524- 3,015)	3,074 (2,951- 3,962)	3,242 (1,852- 5,223)	2,612 (2,102-3,069)
	p		p ₁ =0,0014	p ₁ =0,0235	p ₂ =0,0149
IL-6	Me (Q1- Q3)	16,883 (2,189- 31,550)	11,795 (10,995- 13,448)	20,014 (14,128- 29,357)	14,225 (12,991- 15,552)
	p			p ₂ =0,0438	p ₃ =0,0375
IL-17A	Me (Q1- Q3)	41,479 (39,484- 47,297)	28,705 (18,013- 41,383)	31,467 (21,934- 46,700)	21,442 (15,483- 25,481)
	p		p ₁ =0,0007	p ₁ =0,0073	p ₁ =0,0001 p ₃ =0,0397
IL-18	Me (Q1- Q3)	299,901 (152,369- 379,252)	318,322 (294,417- 367,564)	298,556 (277,605- 454,313)	371,858 (319,835- 412,087)
	p		p ₁ =0,05841		
TNF α	Me (Q1- Q3)	1,431 (0,971- 5,924)	4,450 (3,654- 4,539)	9,071 (4,661- 13,852)	3,204 (2,153-3,952)
	p			p ₁ =0,0272 p ₂ =0,0140	p ₃ =0,0018
G-CSF	Me (Q1- Q3)	52,215 (45,987- 55,941)	1,673 (1,527- 1,883)	73,294 (46,638- 100,589)	30,754 (1,375- 70,466)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0361 p ₂ =0,0001	p ₁ =0,0501 p ₂ =0,0001 p ₃ =0,0164

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

На начальной стадии РТМ в сыворотке повышался уровень TNF α в 2 раза по сравнению с аналогичными данными при миоме и в 6 раз по сравнению с данными в контроле, что может влиять на праймирование Нф и генерацию последними АФК. При распространенном процессе его уровень значительно снижался до контрольных значений (*таблица 36*).

Уровень G-CSF в сыворотке пациентов с миомой в 32 раза снижался, а при начальной стадии РТМ повышался в 1,4 раза и был выше такового в контроле. При распространенном РТМ его уровень снижался по сравнению с таковым в группе контроля (*таблица 36*).

Снижение G-CSF в сыворотке пациентов с миомой и распространенном РТМ соотносилось с показателями при ДОЯ и РЯ III-IV стадии, РШМ Ib-IV стадии. Повышение в сыворотке G-CSF при начальной стадии РТМ способствовало рекрутированию Нф, особенно с незрелым фенотипом, и усилению проопухолевых функций.

Уровни IL-4 и IL-10 в сыворотке пациентов с миомой и РТМ значительно повышались по сравнению с контролем, что соотносится с данными при CIN и РШМ, ДОЯ и РЯ. При этом уровень IL-4 на II-III стадии РТМ был значительно выше такового при миоме (*таблица 37*).

Повышение активности IL-4 ограничивало вызванное G-CSF распространение Нф и миграцию в ткани, влияя на передачу сигналов хемокинов CXCR2-CXCR4 в Нф.

IFN γ был значительно выше в сыворотке пациентов с распространенным РТМ по сравнению с таковым в группе контроля, с миомой, и начальной стадией РТМ (*таблица 37*), что, возможно, вносит определенный вклад в подавление проангиогенных факторов и регуляцию NETos.

Это соотносится с данными при РЯ III-IV стадий. В сыворотке пациентов с миомой и РТМ наблюдалось повышение IL-8 по сравнению с контролем (*таблица 38*). Аналогичная динамика прослеживалась при ДОЯ и РЯ.

Таблица 37 – Уровень противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови при миоме и раке тела матки

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	Миома, n=20	Стадии рака тела матки	
				I стадия, n=42	II-III стадия, n=16
IL-4	Me (Q1- Q3)	1,249 (0,434- 1,998)	2,281 (2,006- 2,557)	2,705 (1,596- 4,300)	3,697 (2,072- 4,086)
	p		p ₁ =0,0003	p ₁ =0,0003	p ₁ =0,0005
IL-10	Me (Q1- Q3)	1,476 (1,275- 1,841)	8,003 (3,977- 10,031)	5,257 (2,117- 9,743)	7,115 (6,092- 8,492)
	p		p ₁ =0,0001	p ₁ =0,0002	p ₁ =0,0001
IFN γ	Me (Q1- Q3)	4,156 (2,087- 5,747)	4,693 (3,674- 5,367)	4,189 (2,390- 10,497)	9,095 (8,024- 10,297)
	p				p ₂ =0,0023

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

Таблица 38 – Уровень хемокинов в сыворотке крови при миоме и раке тела матки

Группа Показатель (пг/мл)		Контроль, n=22	Миома, n=20	Стадии рака тела матки	
				I стадия, n=42	II-III стадия, n=16
IL-8	Me (Q1- Q3)	11,042 (10,300- 14,986)	19,751 (19,232- 20,319)	22,742 (13,346- 27,446)	29,213 (27,394- 33,497)
	p		p ₁ =0,0021	p ₁ =0,0009	p ₁ =0,0001
MCP-1	Me (Q1- Q3)	270,098 (220,1479- 310,852)	197,589 (147,074- 255,145)	299,628 (255,772- 411,753)	236,919 (190,241- 276,357)
	p		p ₁ =0,0129	p ₁ =0,0117 p ₂ =0,0053	p ₃ =0,0073

Примечание: p₁ - данные статистически значимо отличаются от группы контроля; p₂ - данные статистически значимо отличаются от группы с миомой матки; p₃ - данные статистически значимо отличаются от предыдущей стадии.

Уровень МСР-1 в сыворотке при миоме в 1,4 раза снижался и при начальном РТМ значительно повышался относительно такого уровня в контрольной группе и при миоме. При распространенном процессе его уровень значительно снижался до аналогичных показателей в контроле и при миоме (таблица 38). Такое соотношение уровней IL-8 и МСР-1, видимо, определяет патогенез карциномы эндометрия.

В сыворотке крови больных с миомой уровень NE не изменялся ($p=0,9582$). При начальной стадии РТМ в сыворотке крови уровень NE снижался по сравнению с таковым в контроле ($p=0,0096$). Он продолжал снижаться при прогрессировании РТМ по сравнению с контролем ($p=0,0001$), миомой ($p=0,0010$) и начальным РТМ ($p=0,0174$) (рисунок 34). Уровень VEGF в сыворотке крови повышался в 2 раза при миоме ($p=0,0001$) и при прогрессировании РТМ ($p=0,0002$) по сравнению с контролем (рисунок 34), что соответствует аналогичным данным при ДОЯ и РЯ.

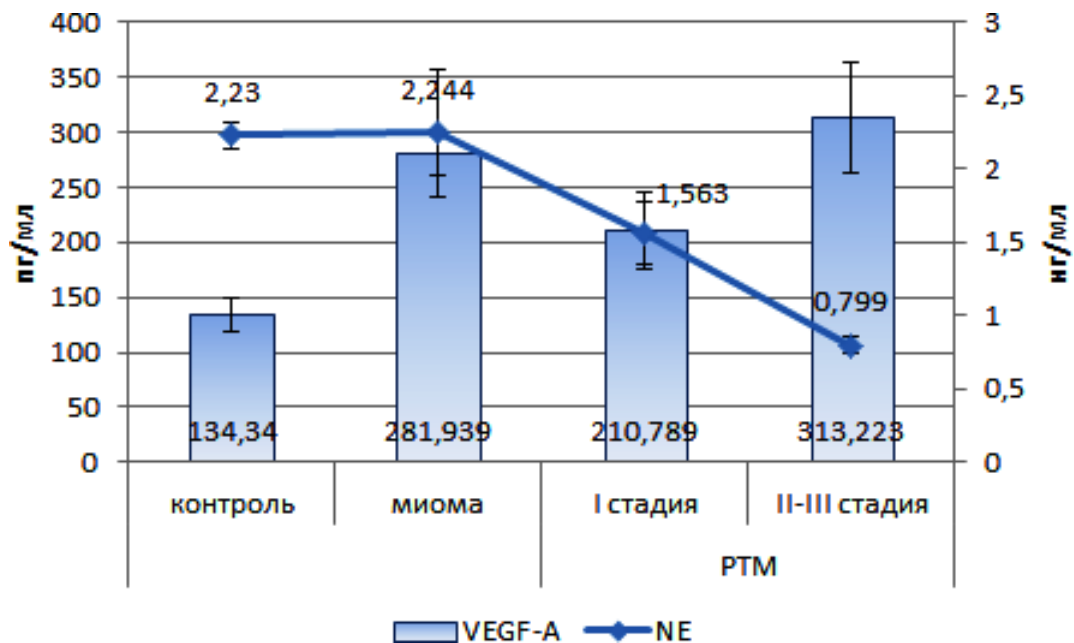


Рисунок 34 – Уровень васкулоэндотелиального фактора роста и нейтрофильной эластазы в сыворотке крови при миоме и прогрессировании рака тела матки

Примечание: РТМ - рак тела матки, NE - нейтрофильная эластаза, VEGF - васкулоэндотелиальный фактор роста.

При миоме и РТМ в сыворотке повышался уровень MMP-1 ($p_1=0,0001$, $p_2=0,0065$) и TIMP-1 ($p_1=0,0001$, $p_2=0,0588$), что соответствует аналогичным данным при CIN и РШМ. Однако уровень TIMP-1 был значимо ниже такого при миоме ($p=0,0079$). Уровень MMP-2 в сыворотке пациентов с миомой возрастал в 1,2 раза ($p=0,0009$), а при РТМ был ниже такового в контроле ($p=0,0211$) и при миоме ($p=0,0453$). MMP-9 ($p=0,0276$) и MMP-13 ($p=0,0001$) снижались в 1,5 и 2,4 раза при РТМ по сравнению с аналогичными показателями в группе контроля (рисунк 35). Снижение уровня MMP-13 в сыворотке при РТМ соотносится с данными при РШМ и РЯ.

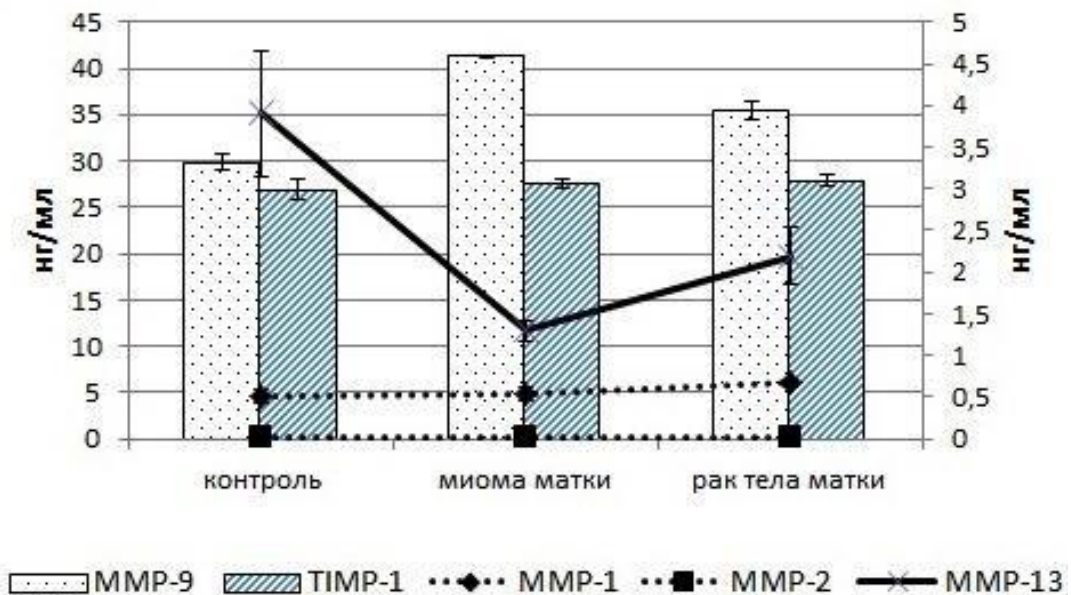


Рисунок 35 – Уровень матричных металлопротеиназ и тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы в сыворотке при миоме и раке тела матки
Примечание: MMP - матричная металлопротеиназа, TIMP - тканевый ингибитор матричных металлопротеиназ.

Таким образом, в сыворотке при миоме повышался уровень MMP-1, MMP-2, TIMP-1, VEGF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 и снижался уровень MMP-13, MCP-1, IL-17A, G-CSF. На начальной стадии РТМ в сыворотке повышались MCP-1, IL-1RA, IL-6, TNF α , G-CSF и снижался IL-1 β по сравнению с миомой. При распространенном РТМ в сыворотке повышался уровень IFN γ , VEGF, IL-1 β , IL-1RA, G-CSF и снижался уровень IL-2, NE. Также при РТМ снижался уровень MMP-2 и MMP-13. Такие изменения могут

свидетельствовать об усилении опухолюассоциированного воспаления при прогрессировании РТМ.

5.6 – Маркеры дифференцировки на этапе первичной диагностики рака тела матки и миомы

В унивариантном анализе логистической регрессии для дифференциальной диагностики между миомой и РТМ статистическую значимость совместно демонстрировали IL-1RA (ОШ 1.02 95% ДИ 1.00-1.028, $p=0.010$) и IL-6 сыворотки крови (ОШ 1.50 95% ДИ 1.04-2.154, $p=0.029$). Площадь под кривой (AUC) такой модели составила 0.977, и РТМ мог быть диагностирован с 96.2% вероятностью (Spec.=0.800, Sens.=0.962) (рисунок 36).

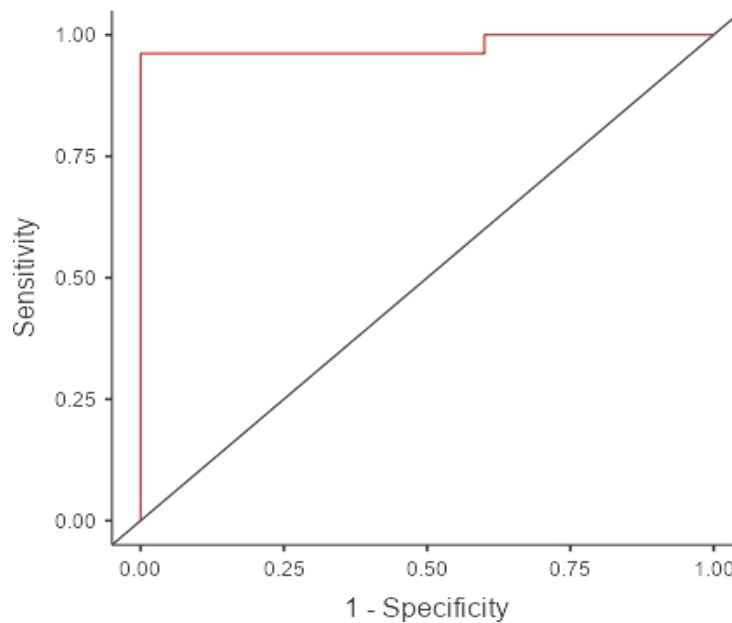


Рисунок 36 – ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики миомы и рака тела матки с учетом показателей IL-1RA и IL-6 сыворотки крови

Риск возникновения РТМ возрастает при одновременно повышенных уровнях IL-1RA (более 284,22 пг/мл) и IL-6 (более 13,45 пг/мл) в сыворотке крови ($R^2=0,824$, $\chi^2=30,5$, $p=0,001$).

В унивариантном анализе логистической регрессии для дифференциальной диагностики между миомой и РТМ статистическую значимость совместно демонстрировали ИЛ (ОШ 0.028 95% ДИ 0.002-0.356,

$p=0.006$) и МСР-1 в циркулирующих Нф (ОШ 1.318 95% ДИ 1.044-1.665, $p=0.020$). Площадь под кривой (AUC) такой модели составила 0.972, и РТМ мог быть диагностирован с 96.0% вероятностью (Spec.=0.900, Sens.=0.960) (рисунок 37). Риск возникновения РТМ возрастает при одновременно повышенных уровнях МСР-1 (более 20,147 пг/мл) в циркулирующих Нф и сниженной способности захватывать частица с помощью NET (менее 1,32 у.е.) ($R^2=0,796$, $\chi^2=28,4$, $p=0,001$).

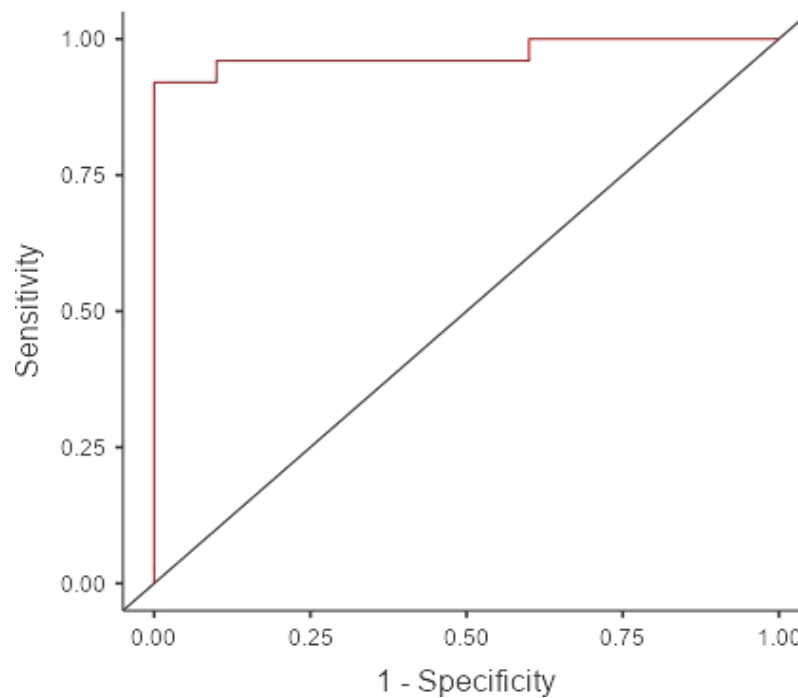


Рисунок 37 – ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики миомы и рака тела матки с учетом показателей индекса ловушек и МСР-1 в циркулирующих нейтрофилах

В унивариантном анализе логистической регрессии для дифференциальной диагностики между миомой и РТМ статистическую значимость совместно демонстрировали IL-1RA (ОШ 1.01 95% ДИ 1.00-1.019, $p=0.021$), МСР-1 сыворотки крови (ОШ 1.02 95% ДИ 1.00-1.040, $p=0.041$). Площадь под кривой (AUC) такой модели составила 0.958, и РТМ мог быть диагностирован с 88.5% вероятностью (Spec.=0.800, Sens.=0.885) (рисунок 38).

Риск возникновения РТМ возрастал при одновременно повышенных уровнях IL-1RA (более 284,22 пг/мл) и МСР-1 (более 255,14 пг/мл) в сыворотке крови ($R^2=0,749$, $\chi^2=26,4$, $p=0,001$).

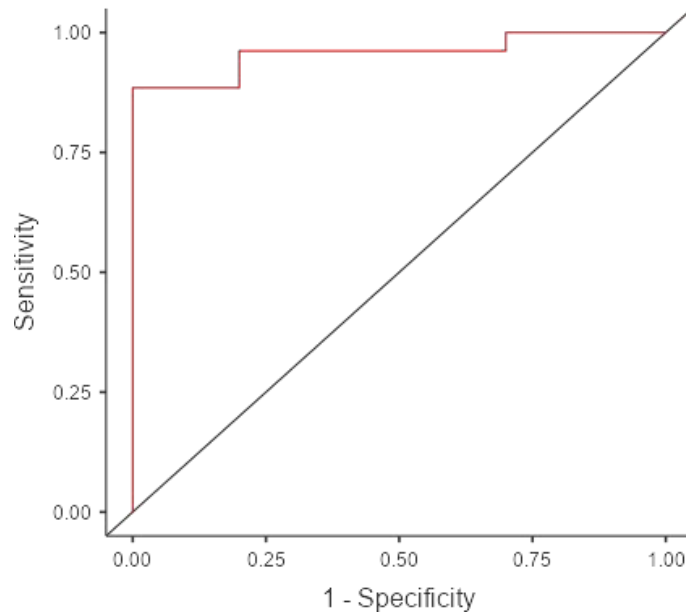


Рисунок 38 – ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики миомы и рака тела матки с учетом показателей IL-1RA и MCP-1 сыворотки крови

Таким образом, при миоме Нф характеризуются повышенной адгезией, дегрануляцией, миелопероксидазной активностью, повышенным уровнем $IFN\gamma$, IL-2, IL-4 формируют N1-подобный фенотип, а сниженная кислородзависимая цитотоксичность, неспособность к завершеному фагоцитозу, повышенное NET-образование, экспрессия NF-kB, VEGF, NE, IL-1 β , IL-6, MMP-9, G-CSF определяют N2-подобный фенотип.

При РТМ противоопухолевые Нф с повышенным содержанием IL-2, IL-4 способны к завершеному фагоцитозу, а проопухолевые нейтрофилы характеризуются повышенной экспрессией NF-kB, VEGF, MMP-9, G-CSF, IL-1 β , IL-6, MCP-1. Маркерами при дифференциальной диагностике РТМ и миомы могут служить - IL-1RA и IL-6, либо IL-1RA и MCP-1 в сыворотке крови; также уровень MCP-1 в циркулирующих Нф и ИЛ.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ
5-Й ГЛАВЫ**

Публикации в изданиях, рецензированных ВАК, и в международных реферативных базах данных Scopus и Web of Science

1. Цитокиновый статус сыворотки крови у больных раком тела матки / Т.В. Абакумова, С.О. Генинг, Д.Р. Долгова, А.В. Фомина, А.А. Михеенко // Вестник РГМУ. 2015. № 2. С.21-22 (РИНЦ - 0.499).
2. Фенотип нейтрофилов периферической крови на начальной стадии рака тела матки / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, Т.П. Генинг, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг // Цитология. 2016. Т.58, № 1. С.23-29 (РИНЦ - 0,622, Scopus).
3. The phenotype of peripheral blood neutrophils during the early stage of endometrial cancer / T.V. Abakumova, I.I. Antoneeva, T.P. Gening, D.R. Dolgova, S.O. Gening // Cell and Tissue Biology. 2016. Vol. 10, iss. 3, 1 May. P. 206-212. DOI: 10.1134/S1990519X16030020 (Scopus).
4. CXCL8 and CCL2 production in circulating neutrophils in endometrial cancer / T. Abakumova, I. Antoneeva, S. Gening, T. Gening, D. Dolgova // Annals of Oncology. 2020. Vol. 31, suppl. 7. P. S1454. doi:10.1016/j.annonc.2020.10.581 (WoS).
5. Абакумова, Т.В. Ангиогенный потенциал нейтрофилов циркулирующей крови при раке эндометрия / Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, С.О. Генинг, И.И. Антонеева // Медицинская иммунология. 2021. №2. С.317-322. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138 (РИНЦ - 0.740, Scopus).
6. Abakumova, T. CCL2 expression and the neutrophil plasma membrane characteristics in blood in different stages of endometrial cancer / T. Abakumova, S. Gening, T. Gening // Annals of Oncology. 2021. Vol. 32, suppl_6. S1345-S1371. 10.1016/annonc/annonc740 (WoS).
7. T. Abakumova, T. CCL2 in Regulation of the Circulating Neutrophils Killing Capacity in the Uterine Body Tumors / T. Abakumova, S. Gening, T. Gening // European Journal of Clinical Investigation. 2021. Vol. 51, iss. S1. doi.org/10.1111/eci.13567 (WoS).

Монографии:

8. Успехи и проблемы современной онкологии: монография / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, В.Ю. Барштейн, Т.П. Генинг, Е.А. Гревцева, Т.А. Круподёрова, Т.Л. Настаушева, Е.А. Рябова, Е.В. Шумейко, Н.В. Шумейко, Н.Б. Юдина, В.П. Волков. Новосибирск: Ассоциация научных сотрудников "Сибирская академическая книга", 2014. 108 с. ISBN: 978-5-4379-0383-4.

9. Абакумова, Т.В. Неспецифический иммунитет при онкогинекологической патологии: монография. Ульяновск: Ульянов. гос. ун-т, 2018. 112 с. ISBN: 978-5-88866-688-3.

ГЛАВА 6 – РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ЦИТОКИНОВ И ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЯИЧНИКОВ, В ПРОГРЕССИИ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИИ, ПРИ МИОМЕ И РАКЕ ТЕЛА МАТКИ

Микроокружение циркулирующих Нф создается цитокинами и хемокинами, которые продуцируются как самой опухолью, так и клетками иммунной системы. Изменение цитокинового окружения определяет про- и противоопухолевую активность Нф [19, 269].

6.1 – Регрессионный анализ взаимосвязи цитокинов семейства IL-1 (IL-1 β , IL-1RA, IL-18) и показателей и показателей циркулирующих нейтрофилов при опухолях женской репродуктивной системы

Рядом исследователей было выявлено, что цитокины играют ключевую роль в модулировании врожденного и адаптивного иммунного ответа [43], в частности, IL-1 β ускоряет выход миелоидов из костного мозга и продлевает продолжительность жизни Нф [244].

Нами была выявлена зависимость уровня IL-1 β в Нф при РЯ от стадии опухолевого процесса ($F=4,444$, $p=0,0025$ (ANOVA)). При этом на начальных стадиях РЯ снижение IL-1 β в Нф коррелировало с увеличением количества CD63⁺Нф ($r=-0,4981$, $p=0,0254$), что представляется логичным, учитывая роль Fas-лиганда в синтезе и секреции IL-1 β [265]. Снижение IL-1 β в Нф коррелировало со сниженным количеством CD95⁺Нф ($r=0,5088$, $p=0,0369$) на начальной стадии РЯ. Корреляционной связи между уровнями IL-1 β в сыворотке и лизате Нф не было обнаружено на всех стадиях РЯ. Вероятно, что при РЯ Нф не являлись основными продуцентами IL-1 β сыворотки.

При местноограниченном РШМ в Нф повышенный IL-1RA обратно умеренно коррелировал с уровнем VEGF-A ($r=-0,4083$, $p=0,0004$), что дает

основание полагать, что внутриклеточный IL-1 β ассоциирован с проангиогенной активностью Нф при распространенном РШМ.

Цитокины семейства IL-1 играют важную роль в инициации каскада передачи сигнала через NF-kB [127]. Нами была выявлена обратная регрессионная зависимость NF-kB Нф от повышенного уровня IL-1 β в сыворотке крови при миоме матки ($F(1.8)=9,1458$, $p=0,0164$, $R^2=0,751$). Это может свидетельствовать о влиянии циркулирующего IL-1 β на активацию проопухолевых функций Нф при миоме.

При местноограниченном РШМ выявлена прямая регрессионная зависимость числа циркулирующих в кровотоке CD95⁺Нф от концентрации IL-1RA в сыворотке крови и обратная зависимость от уровня этого растворимого рецептора количества Нф, продуцирующих активные радикалы (по данным НСТ-теста) ($F(1.16)=19,058$, $p=0,0005$, $R^2=0,5151$ и $F(1.16)=14,774$, $p=0,0014$, $R^2=0,4476$, соответственно), что позволяет предполагать участие IL-1RA в усилении противоопухолевых функций Нф.

Образование NET сопровождается усилением ответа группы цитокинов семейства IL-1, а IL-1RA блокирует продукцию этих цитокинов [253]. Повышенный по сравнению с контролем ИЛ при CIN обратно умеренно коррелировал с концентрацией IL-1 β в Нф ($r=-0,4093$, $p=0,0222$) и IL-1RA в Нф ($r=-0,4699$, $p=0,0491$), что может свидетельствовать об ассоциации IL-1 β и IL-1RA со сниженной киллинговой функцией NET.

При РШМ повышение уровня IL-1RA в Нф ($F=55,032$, $p=0,0001$) и сыворотке ($F=12,766$, $p=0,0008$) было связано со стадией опухолевого процесса.

При CIN уровень IL-1RA в сыворотке крови значимо повышался, а в Нф - понижался, при этом корреляционной зависимости между ними не обнаружено. Вероятно, при CIN Нф не являются основными продуцентами IL-1RA. На начальной стадии РШМ ($r=-0,4060$, $p=0,0004$), при местноограниченном процессе ($r=-0,4168$, $p=0,0003$) и распространенном РШМ ($r=-0,4556$, $p=0,0001$) уровень циркулирующего IL-1RA обратно

коррелировал с умеренной силой с уровнем IL-1RA в Нф. Подобная ситуация была обнаружена и при миоме матки ($r=-0,6848$, $p=0,0288$). Это свидетельствует о том, что концентрация в сыворотке IL-1RA ассоциирована со способностью Нф синтезировать и выбрасывать в сыворотку крови IL-1RA.

По данным литературы [188], при ряде локализаций неоплазмы IL-18 ингибирует в опухолевой ткани экспрессию фактора роста эндотелия сосудов, пролиферацию и метастазирование. В нашем исследовании между уровнем IL-18 в сыворотке крови и в Нф была обнаружена прямая корреляционная связь у пациентов с местноограниченным процессом ($r=0,5047$, $p=0,0001$). Поскольку IL-18 продуцируется различными кроветворными и негематопоэтическими клетками [188], включая макрофаги и дендритные клетки, а также Нф, то, вероятно, что на этой стадии патологического процесса гранулоциты являются основными продуцентами этого цитокина.

В связи с тем, что по выявленным данным при распространенном РТМ уровень IL-18 в сыворотке крови был значимо повышен, а в Нф - снижен по сравнению с контролем, а также между ними была обнаружена высокая прямая корреляционная связь ($r=0,8504$, $p=0,0002$), можно полагать, что синтезируемый нейтрофилами IL-18 при РТМ не вносит вклад в сывороточный уровень этого цитокина.

Ранее были выявлены слабые корреляции между циркулирующими в кровотоке провоспалительными цитокинами (IL-1 β , IL-6, VEGF-A) и NLR при колоректальном раке [329]. В нашем исследовании методом множественной регрессии при РТМ I стадии обнаружена взаимосвязь NLR с уровнем IL-18 и IL-1 β в сыворотке крови ($F(2.23)=6,6762$, $p=0,0052$, $R^2=0,3123$).

При миоме матки нами была выявлена регрессионная взаимосвязь уровня IL-18 в Нф с активностью NF-kB ($F(1.8)=12,843$, $p=0,0071$, $R^2=0,5682$), которая подтверждает ранее полученные данные о том, что биологическая активность IL-18 опосредуется активацией NF-kB [85].

По данным литературы [38], увеличение концентрации IL-18 способствовало накоплению Нф *in vivo*, а нейтрализация IL-18 подавляла

тяжесть воспаления. IL-18 индуцировал повышение экспрессии CD11b, но не влиял на скорость апоптоза Нф. В нашем исследовании на начальной стадии РЯ была выявлена регрессионная взаимосвязь уровня IL-18 крови и количества CD16⁺Нф ($F(1.15)=4,7852$, $p=0,0449$, $R^2=0,1913$), CD11b⁺Нф ($F(1.15)=4,8239$, $p=0,0442$, $R^2=0,1928$) и CD95⁺Нф ($F(1.15)=7,5348$, $p=0,0150$, $R^2=0,2899$), свидетельствующая о способности IL-18 поляризовать Нф в сторону противоопухолевого фенотипа. При РТМ повышение экспрессии CD63, определяющего способность к дегрануляции и противоопухолевые функции Нф, зависело от циркулирующего IL-18 ($F(1.11)=12,866$, $p=0,0043$, $R^2=0,4972$).

Сниженный по сравнению с данными в контрольной группе уровень IL-18 в Нф при ДОЯ заметно и прямо коррелировал с ЧЛ ($r=0,5555$, $p=0,0315$). Таким образом, это не противоречит данным Huang W. et al. (2020), согласно которым стимулированные высокими дозами IL-18 Нф образуют больше NET [229]. При РЯ также наблюдалась обратная умеренная связь между сниженным IL-18 в Нф и повышенным ЧЛ по сравнению с контролем ($r=-0,3645$, $p=0,0039$).

Нами при помощи метода линейной регрессии была обнаружена связь циркулирующего IL-18 со способностью Нф продуцировать АФК в спонтанном НСТ-тесте, которая была заметно снижена на III-IV стадиях РЯ ($F(1.42)=11,400$, $p=0,0015$, $R^2=0,1947$). При начальном РТМ сниженное количество Нф, способных генерировать АФК, методом регрессионного анализа показало зависимость от уровня IL-18 в сыворотке крови ($F(1.16)=6,2566$, $p=0,0236$, $R^2=0,2362$). От концентрации IL-18 в крови зависела также активность МПО при распространенном РТМ ($F(1.11)=6,8422$, $p=0,0240$, $R^2=0,3274$). Таким образом, IL-18, снижал кислородзависимую цитотоксичность при РЯ и РТМ, что может указывать на участие циркулирующего IL-18 в поляризации гранулоцитов в проопухолевый фенотип.

Известно, что отношение VEGF/IL-18 используется при оценке взаимосвязи механизмов ангиогенеза и иммунологического ответа при различных типах рака [359]. При местноограниченном и распространенном РШМ была обнаружена прямая умеренная корреляционная связь IL-18 и VEGF в Нф ($r=0,4661$, $p=0,0005$ и $r=0,5330$, $p=0,0001$, соответственно), что, вероятно, свидетельствует об участии внутриклеточного IL-18 в усилении проангиогенной функции Нф при данной патологии.

Таким образом, при CIN IL-1 β и IL-1RA в Нф ассоциированы со сниженной киллинговой функцией NET, в то время как при ДОЯ и РЯ изменение концентрации IL-18 в Нф влечет за собой трансформацию параметров NETs. Установлено, что внутриклеточные IL-1 β и IL-18 ассоциированы с проангиогенной активностью Нф при распространенном РШМ. А сывороточный уровень IL-1 β и IL-18 при начальном РТМ поддерживает NLR в пределах коридора нормы. Выявлено, что концентрация IL-1RA в сыворотке при миоме ассоциирована со способностью Нф синтезировать этот цитокин. Уровень циркулирующего IL-18 при местноограниченном РШМ ассоциирован с концентрацией в Нф. Было установлено снижение апоптоза Нф при РЯ, связанного со стойким воспалением и повышенным в сыворотке уровнем IL-18, основным источником которого являются сами Нф. Под влиянием циркулирующего IL-18 была снижена цитотоксичность Нф при начальном РТМ, а при распространенном РТМ усиливалась миелопероксидазная активность и способность к дегрануляции. Было выявлено, что циркулирующий IL-1RA при распространении РШМ ассоциирован со снижением способности Нф генерировать АФК и синтезировать ангиогенные факторы.

6.2 – Регрессионный анализ взаимосвязи IL-6 и показателей циркулирующих нейтрофилов при опухолях женской репродуктивной системы

Ранее в работах Micheli D.C. et al. (2012) было указано, что при инвазивной неоплазии по сравнению с контролем уровни IL-6 и IL-8, а также IL-10 и TNF α были повышены в сыворотке и в супернатантах Нф. По данным Kamran N.C. et al (2020), медиана сывороточного IL-6 была выше у пациентов с серозным раком яичников high-grade по сравнению с пациентами с ДОЯ или контрольной группой. В нашем исследовании установлено, что при распространенном РЯ уровень циркулирующего IL-6 прямо значимо коррелировал с уровнем в лизате Нф ($r=0,5626$, $p=0,0245$). Изменение синтеза IL-6 Нф при РШМ зависели от стадии опухолевого роста ($F=107,63$, $p=0,0001$).

Также была обнаружена корреляция между уровнем IL-6 в сыворотке крови и Нф при CIN ($r=-0,7587$, $p=0,0001$), на начальной стадии РШМ ($r=-0,8225$, $p=0,0001$), при местноограниченном ($r=-0,8415$, $p=0,0001$) и распространенном РШМ ($r=-0,8191$, $p=0,0001$). Это подтверждает ранее полученные сведения о том, что при РЯ уровень IL-6 в сыворотке ассоциирован с концентрацией цитокина в Нф. При CIN и РШМ синтезированный Нф IL-6 выбрасывается в кровь, и может поддерживать процесс опухолеассоциированного воспаления.

Нами была выявлена положительная корреляционная связь IL-6 в сыворотке с NLR ($r=0,5201$, $p=0,0468$) при ДОЯ, что также может указывать на участие IL-6 в формировании воспалительного процесса. Есть данные, что повышение уровня IL-6 также может вызывать активацию NF-kB сигнального пути [365]. С помощью множественного регрессионного анализа была обнаружена связь IL-6, IL-4, IL-10 крови с экспрессией NF-kB Нф на III стадии РЯ ($F(3,20)=3,4876$, $p=0,0348$, $R^2=0,2449$), что указывает на влияние циркулирующих цитокинов на активацию Нф.

Методом линейной регрессии была выявлена связь циркулирующего IL-6 и количества Нф, способных к фагоцитозу при ДОЯ ($F(1,13)=5,3930$, $p=0,0371$, $R^2=0,2388$), а также на начальной стадии РЯ ($F(1,13)=10,294$, $p=0,0068$, $R^2=0,3989$), что указывает на поляризацию Нф в сторону проопухолевого фенотипа при данной патологии. При распространенном РШМ на основании проведенного регрессионного анализа была выявлена взаимосвязь количества CD16⁺Нф с уровнем IL-6 в крови ($F(1,11)=16,204$, $p=0,0020$, $R^2=0,5589$), что может свидетельствовать о влиянии IL-6 на способность Нф к фагоцитозу при РШМ.

Предполагают, что накопление АФК вызывает повышение экспрессии воспалительных цитокинов (IL-6, IL-10, IL-11b, IL-1 β) и интерферона (IFN γ 1, IFN α 1) [72], поскольку продуцируемые Нф АФК могут функционировать как мессенджеры, регулируя клеточные сигнальные пути, такие как MAPK/Erk1/2 pathway, Pi 3K/Akt pathway и IKK/NF-kB pathway при раке [214]. Нами было установлено, что при начальных стадиях РЯ IL-6 сыворотки крови увеличивал способность Нф образовывать АФК в индуцированном НСТ-тесте ($F(1,13)=5,120$, $p=0,0414$, $R^2=0,2274$). При распространенном РТМ активность МПО находилась во взаимосвязи, установленной на основании проведенного регрессионного анализа, с уровнем IL-6 ($F(1,11)=6,7631$, $p=0,0247$, $R^2=0,3244$), что подтверждает влияние циркулирующего IL-6 на повышение миелопероксидазной цитотоксичности Нф.

Ранее получены данные, что повышение в плазме уровня воспалительных цитокинов IL-6 и IL-1RA вызывает увеличение продукции NETs [56], а снижение уровня IL-8, IL-6 и TNF- α в плазме – понижение высвобождения NET при плоскоклеточной карциноме полости рта [212]. На основании проведенного регрессионного анализа нами была выявлена взаимосвязь IL-6 с ИЛ Нф ($F(1,13)=8,610$, $p=0,0116$, $R^2=0,3521$) при начальных стадиях РЯ. При РШМ также выявлена связь между IL-6 и ЧЛ в Нф ($r=0,5631$, $p=0,0001$, а повышенный по сравнению с контролем уровень IL-6 в Нф обратно

умеренно коррелировал со сниженным ИЛ (r=-0,3899, p=0,0043), что подтверждает участие ИЛ-6 в процессе NETosis.

Таким образом, ИЛ-6 крови при начальных стадиях РЯ и при ДОЯ связан с фагоцитарной активностью Нф. На терминальных стадиях РЯ увеличивается количество Нф, способных к дегрануляции, образованию NET и высвобождению ИЛ-6. Возможно, что циркулирующий ИЛ-6 через мессенджеры стимулирует активность NF-κB, а внутриклеточный ИЛ-6 активирует образование NET. При РШМ синтезированный Нф ИЛ-6 выбрасывается в кровь, и определяет опухолеассоциированное воспаление. Можно предполагать, что при РТМ ИЛ-6 в сыворотке регулирует миелопероксидазную цитотоксичность.

6.3 – Регрессионный анализ взаимосвязи гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и показателей циркулирующих нейтрофилов при онкогинекологической патологии

Ранее было установлено, что главными источниками G-CSF являются раковые клетки, фибробласты, макрофаги и лимфоциты [37, 163]. При РШМ, раке мочевого пузыря выявлена связь уровня G-CSF в сыворотке крови с расширением популяции Нф [62, 313]. В исследовании удалось выяснить, что при РЯ уровень циркулирующего G-CSF нарастал с увеличением стадии опухолевого процесса (F=58,426, p=0,0001 (ANOVA)) и коррелировал с NLR (r=0,4074, p=0,0011). Однако при ДОЯ концентрация G-CSF в крови была ассоциирована с таковой в Нф (r=0,6750, p=0,0105), что свидетельствует о вкладе Нф в пул циркулирующего G-CSF при данной патологии.

По данным Bar-Yehuda S. et al. (2002), активация пути PI3K/NF-κB, ведет к увеличению продукции G-CSF. В нашем исследовании на основании проведенного регрессионного анализа при CIN установлена обратная взаимосвязь внутриклеточного G-CSF с NF-κB в Нф только в 13% от общей дисперсии (F(1,81)=12,837, p=0,0006, R²=0,1261). Методом множественной

регрессии была выявлена связь суммарно уровней G-CSF, IL-4, IL-10, IL-17A, IFN γ крови с экспрессией NF-kB в ядре Нф на IIb-IV стадии РШМ ($F(5.59)=9,2357$, $p=0,0001$, $R^2=0,3915$).

При РЯ снижение G-CSF в крови сопровождалось снижением ИЛ ($F(2,58)=10,808$, $p=0,0001$, $R^2=0,2464$) и увеличением ЧЛ ($F(1,59)=23,492$, $p=0,0001$, $R^2=0,2726$), что указывает на взаимосвязь G-CSF и киллинговой активности NET.

По данным литературы [100], G-CSF мобилизует циркулирующие Нф человека и усиливает в них экспрессию CD66b, CD11b и CD63. Нами с помощью множественной регрессии было показано, что при РЯ циркулирующий G-CSF совместно с NE оказывает влияние на повышение количества Нф, способных к дегрануляции (CD63⁺Нф) ($F(2,21)=7,1238$, $p=0,0043$, $R^2=0,3474$), суммарно с MMP-13 на количество CD16⁺Нф ($F(2,21)=7,6835$, $p=0,0011$, $R^2=0,1822$).

На начальной стадии РШМ на основании проведенного регрессионного анализа была установлена взаимосвязь G-CSF крови с количеством CD11b⁺Нф ($F(1.19)=5,7315$, $p=0,0271$, $R^2=0,1913$). Методом множественной регрессии была определена связь концентрации циркулирующих G-CSF, IL-4, NE, IL-10, IL-18, VEGF-A с количеством CD16⁺Нф ($F(6.14)=14,701$, $p=0,0003$, $R^2=0,8043$).

На основании регрессионного анализа на IIb-IV стадии РШМ была выявлена обратная связь циркулирующего G-CSF с количеством CD16⁺Нф ($F(1.11)=13,273$, $p=0,0034$, $R^2=0,5056$). Это может свидетельствовать о том, что G-CSF крови активирует Нф при РЯ и на начальной стадии РШМ, и угнетает способность к фагоцитозу при распространенном РШМ.

С помощью множественной линейной регрессии было определено, что при РЯ способность Нф к фагоцитозу зависела от циркулирующих совместно G-CSF и IL-2 ($F(2,58)=17,325$, $p=0,0001$, $R^2=0,3524$). Была обнаружена взаимосвязь циркулирующего G-CSF с ФЧ Нф на IIb-IV стадии РШМ ($F(1.11)=10,237$, $p=0,0085$, $R^2=0,4349$). При миоме матки ФЧ Нф также было связано с G-CSF крови ($F(1.11)=15,275$, $p=0,0024$, $R^2=0,5433$). Это

свидетельствует о том, что циркулирующий G-CSF ассоциирован со сниженной способностью к фагоцитозу при патологии женской репродуктивной системы.

Таким образом, концентрация циркулирующего G-CSF ассоциирована с уровнем G-CSF в Нф при ДОЯ. G-CSF крови может праймировать Нф, усиливая адгезивные способности на начальной стадии РШМ, и способность к дегрануляции на терминальных стадиях РЯ. G-CSF повышает способность Нф вступать на путь NETos, поляризуя Нф в проопухолевый фенотип при РЯ.

6.4 – Регрессионный анализ взаимосвязи интерферона гамма (IFN γ) и показателей циркулирующих нейтрофилов пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями органов женской репродуктивной системы

По данным литературы, IFN I типа индуцирует изменение фенотипа с N2 - на N1-подобный как в мышинных, так и в человеческих Нф [353]. Нами методом парной линейной регрессии при CIN была обнаружена обратная зависимость повышенного внутриклеточного IFN γ в Нф от экспрессии NF-kB ядерной фракции Нф ($F(1.81)=13,241$, $p=0,0005$, $R^2=0,1299$). А методом множественной линейной регрессии на начальной стадии РШМ выявлена зависимость экспрессии NF-kB ядерной фракции Нф от суммарно уровня IFN γ , IL-4, IL-6, IL-10, TNF α крови ($F(5.67)=12,203$, $p=0,0001$, $R^2=0,4376$). Методом множественной регрессии при миоме матки обнаружена связь циркулирующих IFN γ , IL-6 и IL-8 с активностью NF-kB Нф ($F(3.6)=1484,2$, $p=0,0001$, $R^2=0,9979$). Это свидетельствует о том, что в составе коктейлей сывороточных цитокинов IFN γ участвовал в активации Нф, а именно, регуляции главного фактора проопухолевой активности - NF-kB, на стадии Ia РШМ и при миоме матки.

IFN γ способствует образованию NET Нф в эксперименте [246]. При РЯ IFN γ Нф ассоциирован со сниженным ИЛ ($r=-0,5477$, $p=0,0345$).

По данным Khou S. et al. (2020), задержать рост плоскоклеточного рака кожи, а также защитить нормальные ткани от повреждения возможно при повышении синтеза IFN γ лимфоцитами и при снижении в Нф активности аргиназы, продукции АФК и NO *in vivo*. IFN γ и IL-2 могут индуцировать экспрессию нейтрофилами гранзима-B, цитотоксичного для опухолевых клеток [350]. В нашем исследовании при распространенном РЯ была выявлена зависимость количества Нф, продуцирующих АФК в спонтанном (F(1.22)=6,0542, p=0,0221, R²=0,1801) и индуцированном опсонизированным зимозаном (F(1.22)=5,5984, p=0,0272, R²=0,1666) НСТ-тесте от циркулирующего IFN γ . Методом парной линейной регрессии при миоме матки была выявлена обратная связь активных в НСТ-тесте Нф с уровнем IFN γ в крови (F(1.8)=10,142, p=0,0129, R²=0,5039), что подтверждает возможность влияния циркулирующего IFN γ на кислородзависимую цитотоксичность противоопухолевых Нф. Также при РШМ Ib-IIa стадии была определена взаимосвязь IFN γ сыворотки с МПО Нф (F(1.16)=8,151, p=0,0115, R²=0,2961), что может свидетельствовать о возможности влияния циркулирующего IFN γ на миелопероксидазную цитотоксичность Нф при местноограниченном РШМ.

По данным литературы [275], N1-поляризованные Нф характеризуются высокой секрецией IFN γ . В нашем исследовании повышение уровня IFN γ в Нф (F=406,90, p=0,0001 (ANOVA)) и сыворотке (F=6,1620, p=0,0009 (ANOVA)) было связано со стадией РТМ. При миоме матки повышенный уровень IFN γ в Нф коррелировал с уровнем IFN γ в крови (r=0,6401, p=0,0462), что предполагает зависимость циркулирующего уровня IFN γ от синтеза его в Нф.

При РЯ была выявлена корреляционная связь IFN γ крови с NLR (r=0,2627, p=0,0408), а также зависимость уровня IFN γ циркулирующего (F=15,666, p=0,0001 (ANOVA)) и внутриклеточного (F=32,271, p=0,0001 (ANOVA)) от стадии опухолевого процесса. IFN γ , синтезированный в Нф на ранних стадиях РЯ, может быть цитотоксичным для опухолевых клеток, а Нф, в этом случае, имеют противоопухолевый фенотип.

Таким образом, $IFN\gamma$ участвует в активации NF- κ B на стадии Ia РШМ и при миоме матки, ассоциирован со сниженной киллинговой функцией NET при РЯ. $IFN\gamma$ создает условия для поляризации Нф в противоопухолевый фенотип с повышенной цитотоксичностью при местноразличенном РШМ и миоме матки.

6.5 – Регрессионный анализ взаимосвязи IL-17 и показателей циркулирующих нейтрофилов при доброкачественных и злокачественных опухолях яичников, в прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии, при миоме и раке тела матки

По данным литературы [284], IL-17 сыворотки крови стимулирует увеличение продукции в Нф цитотоксических молекул, включая АФК, МПО, TNF-зависимый лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), и $IFN\gamma$, что усиливает способность Нф к прямому уничтожению опухолевых клеток. Нами была обнаружена прямая зависимость способности Нф продуцировать АФК от концентрации IL-17A в крови при ДОЯ ($F(1.13)=5,373$, $p=0,0374$, $R^2=0,2380$) и при миоме ($F(1.8)=8,7851$, $p=0,0180$, $R^2=0,4638$). Наши данные подтверждают результаты исследования Ahmed Nadeem et al. (2019), в котором выявлена активация передачи сигналов IL-17A/IL-17R в Нф, что приводит к усилению регуляции фосфо-NF- κ B, IL-6 и NOX2/ROS. Это может свидетельствовать о существенной роли IL-17A в модуляции воспаления [280].

С помощью множественной регрессии была выявлена взаимосвязь повышенной активности МПО Нф и уровня IL-17A, IL-6 и IL-4 в крови при миоме матки ($F(3.6)=6,8183$, $p=0,0232$, $R^2=0,6597$).

Показан положительный вклад IL-17 в модуляцию опосредованного Нф противоопухолевого иммунитета при плоскоклеточном раке пищевода [173]. В нашем исследовании на участие IL-17A в модуляции адгезионных свойств и способности к дегрануляции Нф указала обратная связь данного цитокина в крови с количеством CD11b⁺Нф пациентов при РЯ I-II стадии ($F(1.15)=5,539$,

$p=0,0326$, $R^2=0,2210$) и CD63⁺Нф на стадии Ib-IV РШМ ($F(1.11)=6,777$, $p=0,0245$, $R^2=0,3249$).

По данным Punt S. et al. (2015), IL-17, экспрессируемый Нф, увеличивает рост клеток или плотность клеточных линий РШМ, что может объяснять один из механизмов онкогенеза на ранней стадии заболевания и способствовать росту опухоли. В нашем исследовании при CIN и РШМ уровень IL-17A в крови не коррелировал с уровнем одноименного цитокина в Нф, что, скорее всего, подтверждает, что Нф не являются основными источниками IL-17A при РШМ. Однако на ранних стадиях РЯ сывороточный уровень IL-17A был ассоциирован с концентрацией IL-17A в Нф ($r=0,6765$, $p=0,0052$). Таким образом, системное воспаление при РЯ, возникающее с участием IL-17 [305], связано с синтезированным IL-17A циркулирующими Нф.

На Ib-IIa стадии РШМ только 12% от общей дисперсии объясняет модель зависимости уровня NF-kB Нф от циркулирующего IL-17A ($F(1.68)=10,345$, $p=0,0019$, $R^2=0,1193$). Снижение уровня IL-17A в крови сопровождалось повышением активности NF-kB в Нф при миоме матки, что подтверждалось на модели линейной регрессии ($F(1.8)=6,9300$, $p=0,0301$, $R^2=0,3972$).

Фагоцитоз является одной из основных функций Нф, и использует при этом различные механизмы. При участии кислородзависимых механизмов происходит активация мембраны при «метаболическом взрыве» и при галогенизации. При нарушении фагоцитоза возникают выраженные иммунологические дефекты. Фагоцитоз сопровождается активацией эпителия, включающей реакцию воспаления. Нф погибают, провоцируя деструкцию собственных тканей за счет выброса ферментов. Нф имеют достаточно низкий уровень фагоцитоза в условиях покоя. Различные активирующий стимулы, появляющиеся в процессе воспаления, либо продуцируемые опухолью, изменяют эффективность фагоцитоза. Эти стимулы включают медиаторы воспаления и цитокины. Сигнализация, которую активируют или блокируют эти стимулы, перестраивает молекулярный механизм фагоцитоза [137].

Эффективность фагоцитоза может также активироваться дифференцировкой клеток [201]. При миоме матки повышение количества Нф, способных к фагоцитозу, обратно регрессионно связано с уровнем IL-17A в крови ($F(1.8)=6,0264$, $p=0,0396$, $R^2=0,3583$). А при РШМ Ib-IV стадии с помощью линейной регрессии была выявлена прямая зависимость ФЧ Нф ($F(1.11)=6,562$, $p=0,0264$, $R^2=0,3167$) от уровня циркулирующего IL-17A.

По данным литературы, IL-17, продуцируемый клетками, гепатоцеллюлярной карциномы способствует неоангиогенезу, привлечению Нф и росту опухоли *in vivo* [155]. Нами установлено, что на Ib-IIa и Ib-IV стадии РШМ продуцируемый Нф IL-17A был ассоциирован с VEGF-A в Нф ($r=0,4294$, $p=0,0002$ и $r=0,4702$, $p=0,0007$, соответственно). Между уровнем IL-17A и VEGF-A в Нф была выявлена корреляционная связь при РТМ I стадии ($r=-0,3947$, $p=0,0460$) и при РТМ II стадии ($r=0,7210$, $p=0,0054$). Это указывает на то, что внутриклеточный IL-17A при распространенных формах РШМ и РТМ ассоциирован с VEGF в Нф, что определяет проангиогенный профиль последних.

Таким образом, повышенный по сравнению с контролем циркулирующий IL-17A при ДОЯ увеличивает цитотоксичность Нф, а на ранних стадиях РЯ увеличивает адгезионные способности Нф. IL-17A крови при распространенном РШМ способствует снижению фагоцитарной функции и дегрануляции Нф. Снижение уровня циркулирующего IL-17A при миоме коррелирует со снижением цитотоксичности Нф, увеличением фагоцитарной и миелопероксидазной активности, и повышением экспрессии NF- κ B в Нф. Синтезированный Нф IL-17A усиливает их ангиогенный профиль при РТМ и РШМ.

6.6 – Регрессионный анализ взаимосвязи цитокинов семейства IL-2 (IL-2, IL-4) и IL-10 и показателей циркулирующих нейтрофилов при прогрессировании рака яичников, шейки и тела матки

По результатам экспериментального исследования Pericle F. et al. (1996), при раке молочной железы цитотоксичность Нф повышается при влиянии на них IL-2. Нами при распространенном РЯ выявлена обратная заметная корреляционная связь повышенного уровня нейтрофилокина IL-2 со сниженной способностью Нф образовывать АФК в спонтанном НСТ-тесте ($r=-0,6354$, $p=0,0001$) и умеренная корреляционная связь в индуцированном НСТ-тесте (с неопсонизированным зимозаном $r=-0,5044$, $p=0,0003$, с опсонизированным зимозаном $r=-0,4214$, $p=0,0007$). Это указывает на то, что при распространенном РЯ IL-2 ассоциирован со снижением цитотоксичности Нф в отношении опухолевых клеток.

По результатам нашего исследования при РЯ начальной стадии циркулирующий IL-2 коррелировал с NLR ($r=-0,3973$, $p=0,0015$) и внутриклеточным IL-2 ($r=0,8258$, $p=0,0215$), что предполагает способность Нф при РЯ синтезировать IL-2 и вносить значимый вклад в его сывороточный пул.

Повышение по сравнению с контролем уровня IL-2 в крови ($F=23,929$, $p=0,0001$ (ANOVA)) и Нф ($F=59,607$, $p=0,0001$ (ANOVA)) было связано со стадией опухолевого процесса в шейке матки. Вероятно, при CIN, синтезируемый Нф IL-2, выбрасывается в микроокружение, что подтверждалась корреляционной связью между циркулирующим и внутриклеточным IL-2 ($r=0,3598$, $p=0,0008$). При распространенном РТМ сниженный уровень IL-2 в крови ассоциирован с повышенной концентрацией IL-2 в Нф ($r=-0,7839$, $p=0,0015$), что указывает на накопление IL-2 внутри клетки.

При РЯ наблюдалась обратная зависимость синтеза IL-2 в Нф от экспрессии NF-kB ($F(1.59)=13,719$, $p=0,0005$, $R^2=0,1749$). 43% от общей дисперсии объясняла модель включения IL-2, синтезируемого Нф, в NF-kB-зависимый сигналинг при местноограниченном РШМ ($F(1.68)=4,108$, $p=0,0466$, $R^2=0,4310$) и 5,6% на стадии Пб-IV РШМ ($F(1.63)=4,8287$, $p=0,0317$, $R^2=0,0564$). При миоме матки экспрессия NF-kB в Нф находилась в обратной взаимосвязи с уровнем IL-2 в крови ($F(1.8)=9,7316$, $p=0,0142$, $R^2=0,4924$).

Полученные данные свидетельствуют о связи концентрации внутриклеточного IL-2 с активностью NF- κ B Нф при местноограниченном РШМ, и усилении проопухолевых функции Нф при миоме матки под влиянием циркулирующего IL-2.

Нами также была обнаружена отрицательная умеренная корреляционная связь между уровнем IL-2 в Нф и ЧЛ ($r=-0,4709$, $p=0,0001$), что указывает на участие IL-2 в образовании NET при РЯ. При этом повышенный, по сравнению с CIN, уровень IL-2 в Нф обратно высоко коррелировал со сниженным ИЛ ($r=-0,7266$, $p=0,0006$) и заметно коррелировал с повышенным ЧЛ ($r=-0,5769$, $p=0,0122$), что подтверждает участие внутриклеточного IL-2 в процессе вступления клетки на путь NETos при РШМ. Выявлена заметная прямая корреляционная связь повышенной при миоме матки концентрации IL-2 в Нф и ИЛ ($r=0,6848$, $p=0,0289$). При начальном РТМ методом множественной регрессии была обнаружена связь способности Нф образовывать NET с уровнем IL-2 и VEGF-A в сыворотке ($F(2,22)=6,0983$, $p=0,0078$, $R^2=0,2982$), а сниженный ИЛ связан с IL-2 и IL-10 ($F(2,22)=6,5260$, $p=0,0059$, $R^2=0,3153$). Это свидетельствует о том, что нейтрофилокин IL-2 только при миоме усиливает, а при РЯ и CIN снижает киллинговые функции NET, а циркулирующий IL-2 способствует NETos при нераспространенном РТМ, что усиливает проопухолевые свойства Нф.

На основании проведенного регрессионного анализа при миоме матки была выявлена обратная связь ФЧ Нф с циркулирующим IL-2 ($F(1,8)=11,443$, $p=0,0096$, $R^2=0,5371$), что указывает на роль IL-2 в поляризации Нф в сторону проопухолевого фенотипа.

Методом парной линейной регрессии была обнаружена зависимость количества CD63⁺Нф от уровня сывороточного IL-2 при ДОЯ ($F(1,13)=5,220$, $p=0,0398$, $R^2=0,2316$) и при распространенном РШМ ($F(1,11)=9,734$, $p=0,0097$, $R^2=0,4212$). С помощью множественной регрессии на III стадии РЯ была выявлена взаимосвязь повышенного количества CD95⁺Нф с уровнем IL-2 и NE в крови ($F(2,21)=7,5828$, $p=0,0033$, $R^2=0,3640$). Это может свидетельствовать

об участии сывороточного IL-2 в поляризации Нф в сторону противоопухолевого фенотипа при распространенных формах РШМ и РЯ.

В нашем исследовании при ДОЯ методом множественного регрессионного анализа было выявлено суммарно влияние циркулирующих IL-2, TIMP-1, MCP-1, IL-18 на увеличение ригидности мембраны Нф ($F(4.10)=9,6878$, $p=0,0018$, $R^2=0,7128$).

Таким образом, циркулирующий IL-2 при ДОЯ причастен к увеличению ригидности мембраны Нф, влияет на способность Нф к дегрануляции при ДОЯ и распространенном РШМ. На начальной стадии РЯ уровень циркулирующего IL-2 ассоциирован с количеством синтезируемого IL-2 в Нф. При распространенном РЯ сывороточный IL-2 снижает способность Нф генерировать АФК и способствует вступлению на путь апоптоза. Циркулирующий IL-2 усиливает экспрессию NF- κ B в Нф при миоме, а синтезируемый IL-2 в Нф при местноразнограниченном РШМ входит в NF- κ B-зависимый сигналинг. Было выявлено, что нейтрофилокин IL-2 только при миоме усиливал, а при РЯ и CIN снижал киллинговые функции NET, а циркулирующий IL-2 способствовал NETos при нераспространенном РТМ, что усиливает проопухолевые свойства Нф. Циркулирующий IL-2 снижает фагоцитарную активность Нф при миоме.

По данным Bednarz-Misa I. et al. (2020), циркулирующий IL-4 был повышен и связан с прогрессированием колоректального рака и рака пищевода. Доказано присутствие IL-4 внутри гранул Нф, которые могут высвобождаться в присутствии ионов Ca^{2+} [176]. В нашем исследовании при CIN уровень IL-4 в крови и Нф был повышен по сравнению с контролем, и между этими параметрами обнаружена прямая умеренная связь ($r=0,3555$, $p=0,0009$). При РЯ на начальной стадии ($r=0,9779$, $p=0,0025$) и при распространенном процессе ($r=0,9037$, $p=0,0014$) уровень циркулирующего IL-4 ассоциирован с концентрацией этого цитокина в Нф, что указывало на вклад Нф в пул сывороточного IL-4 при РЯ.

Повышенный по сравнению с контролем уровень IL-4 сыворотки крови пациентов при ДОЯ был взаимосвязан с фагоцитарной активностью Нф, что подтверждалось обратной связью IL-4 сыворотки с фагоцитарной активностью Нф ($F(1.13)=7,6142$, $p=0,0162$, $R^2=0,3209$).

На основании проведенного нами регрессионного анализа при местноограниченном РШМ выявлена взаимосвязь циркулирующего IL-4 с количеством активных Нф в индуцированном НСТ-тесте (с неопсонизированным зимозаном $F(1.16)=29,428$, $p=0,0001$, $R^2=0,6257$ и с опсонизированным зимозаном $F(1.16)=17,695$, $p=0,0007$, $R^2=0,4955$, соответственно). Если предположить, что реакция с зимозаном позволяет оценить наличие и количество Нф, способных связаться с зимозановыми рецепторами на опухолевых клетках, то выявленная связь IL-4 с показателями НСТ-теста может свидетельствовать о роли циркулирующего IL-4 в поляризации Нф в противоопухолевый фенотип. Также на этой стадии РШМ увеличение экспрессии CD16 на Нф зависело от IL-4 крови ($F(1.16)=7,797$, $p=0,0130$, $R^2=0,2856$, соответственно), что указывает на усиление способности к фагоцитозу - важной противоопухолевой функции Нф.

В исследовании удалось выяснить, что при распространенном РШМ сниженная концентрация IL-4 в Нф ($r=-0,5605$, $p=0,0001$) была ассоциирована с повышенным уровнем VEGF в Нф, что указывает на снижение противоопухолевых функций и усиление проангиогенных свойств Нф на данной стадии РШМ.

Таким образом, при ДОЯ циркулирующий IL-4 снижает фагоцитарную активность Нф, а при местноограниченном РШМ увеличивает способность Нф к фагоцитозу. Установлено, что при CIN, на начальной стадии и при распространенном РЯ уровень циркулирующего IL-4 напрямую зависит от способности Нф его синтезировать. Также при местноограниченном РШМ активность IL-4 определяет способность Нф к генерации АФК. Влияние IL-4 на Нф при миоме и РТМ выявлено не было.

Ранее получены данные о том, что противовоспалительные свойства IL-4, IL-10 связаны с их способностью подавлять выработку провоспалительных цитокинов и способствовать высвобождению антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA) [223]. IL-10 не контролирует напрямую активацию фагоцитов крови, а ингибирует продукцию АФК в очаге воспаления [230]. В нашем исследовании методом множественной регрессии при РЯ была выявлена связь IL-10 и IL-1RA со способностью продуцировать АФК в индуцированном НСТ-тесте с неопсонизированным зимозаном ($F(2.58)=8,034$, $p=0,0001$, $R^2=0,1899$). Также обнаружилось совместное влияние IL-10 и G-CSF на количество активированных Нф в спонтанном НСТ-тесте при РЯ I-II стадии ($F(2.58)=12,307$, $p=0,0004$, $R^2=0,2737$).

Известно, что IL-10 может оказывать мощный регуляторный эффект на фагоцитарную функцию Нф при воспалении [301]. При ДОЯ уровень IL-10 в крови значимо повышался по сравнению с контролем и находился во взаимосвязи с количеством Нф, вступивших в фагоцитоз ($F(1.13)=26,632$, $p=0,0002$, $R^2=0,6467$). При РЯ I-II стадии в ходе линейной регрессии выявлена обратная связь повышенного сывороточного IL-10 и сниженного ФЧ Нф ($F(1.13)=6,657$, $p=0,0228$, $R^2=0,2878$). На начальной стадии РЯ сниженный уровень IL-10 в Нф обратно заметно коррелировал с повышенным ЧЛ ($r=-0,6811$, $p=0,0052$).

По данным Gallová L. et al. (2004), IL-10 не контролирует напрямую активацию Нф и экспрессию молекул адгезии (CD11b, CD15, CD62L, CD31) [136]. В результате проведенного нами регрессионного анализа была выявлена обратная связь повышенного IL-10 крови с количеством циркулирующих CD11b⁺Нф при начальной стадии РЯ ($F(1.15)=11,489$, $p=0,0040$, $R^2=0,3959$) и с количеством CD95⁺Нф при нераспространенном РТМ ($F(1.11)=14,216$, $p=0,0031$, $R^2=0,5241$), что, возможно, свидетельствует об угнетении адгезивных функций и способности к апоптозу при начальных стадиях РЯ и РТМ, усиливая проопухолевую функцию Нф.

По данным литературы [185], противовоспалительный IL-10 модулирует активацию Нф, предотвращая аутокринные активирующие петли и механизмы прайминга Нф при контакте с липополисахаридом. В нашем исследовании методом множественной регрессии при распространенном РТМ была обнаружена связь NF-kB Нф с циркулирующими в крови IL-10 и IL-1 β ($F(2.10)=5,6173$, $p=0,0232$, $R^2=0,4349$), а внутриклеточный IL-10 связан с активностью NF-kB в Нф ($F(1.11)=15,275$, $p=0,0024$, $R^2=0,5433$). В результате множественной регрессии на стадии Ib-IIa РШМ экспрессия NF-kB в Нф зависела от циркулирующих IL-10 и IL-4 одновременно ($F(2.67)=13,043$, $p=0,0002$, $R^2=0,2587$). Нейтрофилокин IL-10 имел обратную связь с экспрессией NF-kB при миоме матки ($F(1.8)=7,0386$, $p=0,0291$, $R^2=0,4015$). Таким образом, в NF-kB-сигналинг IL-10 входит при миоме и распространенном РТМ.

С использованием метода линейной регрессии при местноограниченном РШМ нами была выявлена связь ригидности мембраны Нф с повышенным уровнем IL-10 в крови в 22% от общей дисперсии ($F(1.16)=5,7278$, $p=0,0293$, $R^2=0,2176$), а при начальном РТМ в 17% от общей дисперсии ($F(1.24)=6,139$, $p=0,0206$, $R^2=0,1705$).

Внутриклеточный IL-10 при местноограниченном и распространенном РШМ ассоциирован с VEGF в Нф ($r=-0,4083$, $p=0,0004$ и $r=-0,4986$, $p=0,0002$, соответственно), что указывает на снижение противоопухолевых функций Нф на этих стадиях развития неоплазмы.

Таким образом, циркулирующий IL-10 активирует NF-kB в Нф при распространенном РТМ, при этом внутриклеточный IL-10 входит в NF-kB-сигналинг при миоме и распространенном РТМ. Установлено, что на начальной стадии РЯ циркулирующий IL-10 ассоциирован со снижением переваривающей и адгезивной способности Нф. Внутриклеточный IL-10 ассоциирован с повышенной способностью образовывать NET при РЯ, а при прогрессировании РШМ усиливать проангиогенные функции Нф.

6.7 – Регрессионный анализ взаимосвязи хемокинов (IL-8 и MCP-1) и показателей циркулирующих нейтрофилов при доброкачественных и злокачественных опухолях яичников и тела матки, в прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии

В ряде исследований указано, что при РЯ синтезируемые опухолевыми клетками IL-8, GRO-a, GRO-b и G-CSF усиливают миграцию Нф в премеагстатическую сальниковую нишу и способствуют образованию ловушек. Последние поддерживают метастазирование опухоли, захватывая циркулирующие раковые клетки яичников [145, 263]. Нами были обнаружены обратные корреляционные связи умеренной силы между внутриклеточным IL-8 и повышенным ЧЛ при РЯ ($r=-0,4635$, $p=0,0002$) и при CIN ($r=-0,3766$, $p=0,0374$), подтверждающие участие IL-8 в образовании NET.

Также нами была выявлена зависимость способности Нф образовывать АФК в спонтанном НСТ-тесте от уровня циркулирующего IL-8 на начальной стадии РЯ ($F(1.13)=6,181$, $p=0,0273$, $R^2=0,2701$) и при РШМ Ia стадии ($F(1.19)=7,1449$, $p=0,0150$, $R^2=0,2350$), что способствует поляризации Нф в сторону проопухолевого фенотипа на начальных стадиях канцерогенеза.

По данным литературы [121], MCP-1 и IL-8 привлекают профессиональные фагоциты через клеточный ингибитор апоптоза (сIAP)-1. В нашем исследовании при ДОЯ уровень IL-8 в крови значимо повышался и имел обратную связь с количеством CD95⁺Нф ($F(1.13)=6,486$, $p=0,0243$, $R^2=0,2815$). При распространенном РТМ количество CD95⁺Нф регрессионно связано с уровнем MCP-1 в сыворотке крови ($F(1.11)=5,0901$, $p=0,0454$, $R^2=0,2542$). IL-8 является основным фактором, регулирующим экспрессию CD11b в Нф [218]. В результате нашего исследования на стадии IIb-IV РШМ была обнаружена обратная регрессионная взаимосвязь повышенного уровня IL-8 в крови со сниженным количеством активных CD11b⁺Нф ($F(1.11)=4,9609$, $p=0,0477$, $R^2=0,2482$). Это подтверждает участие IL-8 в снижении количества Нф в популяции с противоопухолевыми свойствами при ДОЯ и распространенном РШМ.

Индукцированный гипоксией IL-8 является ключевой сигнальной осью при рекрутировании Нф в ходе канцерогенеза [171]. В ходе регрессионного анализа нами выявлена обратная взаимосвязь синтезируемого Нф IL-8 с экспрессией NF-kB в 21% от общей дисперсии ($F(1.59)=17,474$, $p=0,0001$, $R^2=0,2154$) на терминальных стадиях РЯ.

Корреляционный анализ указал на положительную связь уровня IL-8 в лизате Нф и сыворотке крови при РЯ ($r=0,5266$, $p=0,0155$) и при CIN ($r=0,3694$, $p=0,0006$), что, вероятно, указывает на участие Нф в поддержании уровня сывороточного IL-8.

По данным Lundahl J. et al. (2012), VEGF, IL-6 и IL-8 способствуют увеличению проницаемости эндотелия и миграции Нф. В нашем исследовании при Ib-IV стадиях РШМ сниженный внутриклеточный уровень IL-8 был ассоциирован с повышенным VEGF-A в Нф ($r=-0,437$, $p=0,0001$).

Таким образом, циркулирующий IL-8 при CIN и РЯ ассоциирован с уровнем IL-8 в Нф. Высвобождаемый IL-8 при РЯ может использовать прямую петлю для рекрутирования Нф. Установлено, что повышающийся уровень IL-8 в крови сопровождается снижением адгезионных способностей Нф при РШМ и способности к апоптозу при ДОЯ. Влияния IL-8 на функции Нф при миоме и РТМ не обнаружены.

Между уровнем MCP-1 в сыворотке и Нф была обнаружена заметная корреляционная связь при ДОЯ ($r=-0,6321$, $p=0,0027$) и умеренная при РЯ ($r=0,4548$, $p=0,0164$), что свидетельствует об отсутствии вклада синтезируемого Нф MCP-1 в сывороточный пул данного хемокина при ДОЯ и заметный вклад синтезируемого Нф MCP-1 в циркулирующий пул при РЯ.

По данным литературы [317], при контакте Нф с клетками рака молочной железы, в Нф увеличивается экспрессия MCP-1 и способность образовывать NET. Нами была выявлена прямая корреляционная связь ИЛ с MCP-1 в Нф заметной силы ($r=0,5279$, $p=0,0430$) на начальной стадии РЯ. Это может свидетельствовать об участии MCP-1 Нф в образовании NET и привлечении иммунокомпетентных клеток при развитии РЯ.

Методом линейной регрессии была выявлена обратная связь циркулирующего МСР-1 с ригидностью мембраны Нф при миоме матки ($F(1.8)=5,4827$, $p=0,0473$, $R^2=0,3325$) и прямая связь с ФЧ Нф при распространенном РТМ ($F(1.11)=8,1450$, $p=0,0157$, $R^2=0,3732$).

Таким образом, ригидность мембраны Нф при миоме, фагоцитарная активность при РТМ зависели от циркулирующего МСР-1. Влияния циркулирующего МСР-1 на фенотип Нф при ДОЯ, РЯ, CIN, РШМ не выявлено. Однако концентрация внутриклеточного МСР-1 ассоциирована со способностью к NETos при РЯ I-II стадии.

6.8 – Регрессионный анализ взаимосвязи TNF α и показателей циркулирующих нейтрофилов при неопластических процессах в органах женской репродуктивной системы

В исследованиях указано, что высокий системный уровень TNF α и IL-8 инициирует активацию и миграцию Нф в очаг воспаления [215, 238, 337]. Методом линейной регрессии нами была выявлена зависимость количества Нф, способных к дегрануляции, от циркулирующего TNF α в 40% от общей дисперсии ($F(1.13)=10,052$, $p=0,0074$, $R^2=0,3926$) при ДОЯ, что подтверждает участие цитокина в активации Нф при данной патологии. При РТМ I стадии снижение количества CD63⁺Нф обратно взаимосвязано с повышением, по сравнению с миомой, уровнем TNF α в сыворотке только в 24% от общей дисперсии ($F(1.11)=4,8916$, $p=0,00491$, $R^2=0,2449$). Также методом линейной регрессии при миоме матки была обнаружена обратная связь экспрессии маркера адгезии Нф, CD11b, с уровнем TNF α в сыворотке в 41,5% случаев от общей дисперсии ($F(1.18)=7,3873$, $p=0,0263$, $R^2=0,4151$). Это свидетельствует о том, что циркулирующий TNF α при миоме и нераспространенном РТМ может способствовать поляризации Нф в проопухолевый фенотип.

В нашем исследовании синтезируемый Нф TNF α на начальной стадии РЯ имел более сильную регрессионную связь с NF-kB, чем при III-IV стадии

($F(1.15)=8,1818$, $p=0,0191$, $R^2=0,3098$ и $F(1.59)=4,1887$, $p=0,0452$, $R^2=0,0505$, соответственно).

Также мы выявили обратную корреляционную связь заметной силы между уровнем TNF α в Нф и сниженным ИЛ ($r=-0,5838$, $p=0,0223$) при начальном РЯ. А на IIb-IV стадии РШМ внутриклеточный TNF α прямо высоко коррелировал с ЧЛ на ($r=0,8338$, $p=0,0004$). Таким образом, при начальном РЯ TNF α в Нф ассоциирован со сниженным ИЛ, а при распространенном РШМ с повышенным ЧЛ, что указывает на участие TNF α в NETos при изученных патологиях.

Концентрация TNF α в крови при CIN ассоциирована с внутриклеточным уровнем TNF α в Нф ($r=0,4684$, $p=0,0001$). На стадии Ia и Ib-IIa РШМ уровень TNF α в сыворотке и Нф был повышен относительно контроля и CIN, но корреляционных связей между ними не обнаружено. Также выявлена связь повышенного TNF α в крови ($F=10,357$, $p=0,0001$ (ANOVA)) и Нф ($F=19,461$, $p=0,0001$ (ANOVA)) со стадией опухолевого роста шейки матки.

Одновременное повышение в опухолевой ткани молочной железы мышцей TNF α и VEGF-A вызывает воспаление и ангиогенез [322]. Нами было выявлено, что уровень TNF α в Нф коррелировал с уровнем VEGF-A в Нф при IIb-IV стадии РШМ ($r=0,3713$, $p=0,0023$), что указывает на влияние TNF α на ангиогенные свойства Нф.

Таким образом, TNF α при начальных стадиях РЯ входит в NF-kB зависимый сигналинг Нф, способствует повышению ИЛ. При ДОЯ и начальных стадиях РТМ количество CD63⁺Нф зависит от уровня TNF α крови. При CIN циркулирующий TNF α ассоциирован с уровнем цитокина, продуцируемого в Нф, а при распространенном РШМ продуцируемый Нф TNF α ассоциирован с продукцией VEGF-A в Нф, и со способностью образовывать NET. При миоме циркулирующий TNF α повышает адгезионные свойства Нф.

6.9 – Регрессионный анализ взаимосвязи нейтрофильной эластазы и показателей циркулирующих нейтрофилов при онкогинекологической патологии

Показано, что нейтрофильная эластаза (NE), обнаруженная в первичных гранулах Нф, способствует инициированию плоскоклеточной опухоли в легких, опосредованной воспалением [81]. В экспериментальной работе Shu-Chuan Ho et al. (2017), было доказано, что NE является стимулятором неканонического пути RelB/NF-kB. Нами методом регрессионного анализа была выявлена взаимосвязь экспрессии NF-kB с уровнем NE в Нф. Причем, при ДОЯ зависимость была сильнее ($F(1,13)=6,5964$, $p=0,0233$, $R^2=0,2855$), чем при РЯ ($F(1,59)=5,0837$, $p=0,0279$, $R^2=0,0637$), что позволяет предполагать участие NF-kB в регуляции синтеза NE Нф преимущественно при ДОЯ. Также от активности NE в сыворотке обратно зависела экспрессия NF-kB Нф при миоме ($F(1,8)=14,155$, $p=0,0055$, $R^2=0,5937$).

По литературным данным известно, что NE, продуцируемая Нф, может способствовать миграции и экстравазации опухолевых клеток [113] и экспрессии CD11b Нф [258]. В нашем исследовании с помощью линейной регрессии была выявлена обратная связь NE крови обратно с количеством активных CD11b⁺Нф при РШМ ($F(1,11)=7,9398$, $p=0,0167$, $R^2=0,3664$), и прямая связь с количеством CD63⁺Нф при распространенном РЯ ($F(1,42)=11,032$, $p=0,0019$, $R^2=0,1892$).

В исследованиях показано, что индуцированный эластазой апоптоз эпителиальных клеток опосредуется через NF-kB и p53 [198]. Количество CD95⁺Нф взаимосвязано с сывороточной NE на начальной стадии РЯ ($F(1,15)=4,8083$, $p=0,0445$, $R^2=0,1922$) и при распространенном РЯ ($F(1,42)=14,092$, $p=0,0005$, $R^2=0,2334$). В экспериментальном исследовании *in vitro* Xiaoliang Wang et al. (2020) показано, что NE не запускает некроптоз. В нашем исследовании при миоме, повышенное по сравнению с контролем количество CD95⁺Нф, способных к апоптозу, регрессионно было связано с

уровнем NE в сыворотке ($F(1.8)=5,9842$, $p=0,0402$, $R^2=0,3564$). Таким образом, циркулирующая NE влияет на адгезионные свойства Нф при РШМ, запускает дегрануляцию и апоптоз Нф при РЯ.

По данным Millrud C.R. et al (2017), активированные Нф обладают противоопухолевой активностью, образуя внеклеточные ловушки при плоскоклеточном раке головы и шеи. В исследовании Huang H. et al. (2020) указано, что NE и NET выполняют ключевую регуляторную функцию в микросреде опухоли, участвуя в пролиферации опухоли, отдаленных метастазов, тромбозов, связанных с опухолью. NE, высвобождаемая из NET, усиливает митохондриальный биогенез и ускоренный рост опухолевых клеток [254]. Методом множественной регрессии было выявлено влияние циркулирующих NE, VEGF, TNF α , IL-2, IL-6, IL-17A на ЧЛ при РЯ ($F(6.17)=5,3407$, $p=0,0029$, $R^2=0,5310$). При РШМ обнаружена умеренная обратная корреляционная связь внутриклеточной NE с ЧЛ ($r=-0,4074$, $p=0,0031$). Таким образом, при РЯ циркулирующая NE способствовала поляризации Нф в сторону проопухолевого фенотипа, а внутриклеточная NE, ассоциированная с параметрами NET при РШМ, возможно, способствовала прогрессированию опухоли.

Чрезмерная активация Нф приводит к высвобождению NE [252]. На терминальных стадиях РЯ повышенный в крови уровень NE ассоциирован с уровнем NE в Нф ($r=0,4351$, $p=0,0365$), что подтверждает активацию Нф и их основной вклад в увеличение уровня циркулирующей NE. Сывороточная NE регрессионно взаимосвязана с NLR при миоме ($F(1.8)=6,1712$, $p=0,0379$, $R^2=0,3649$).

Нф осуществляют свою роль посредством фагоцитоза, дегрануляции и производства АФК [296]. Способность Нф к фагоцитозу при миоме обратно регрессионно связана с уровнем NE в сыворотке ($F(1.8)=5,4563$, $p=0,0477$, $R^2=0,3312$).

По данным Nattar K. et al. (2010), NE и АФК Нф повышают проницаемость эндотелия легких и стимулирует отек легких в модели острого

гранулематоза Вегенера. В нашем исследовании, при начальном РШМ циркулирующая NE была взаимосвязана со сниженным количеством активных Нф в индуцированном НСТ-тесте (с неопсонизированным зимозаном $F(1.16)=6,9840$, $p=0,0178$, $R^2=0,2603$ и с опсонизированным зимозаном $F(1.16)=6,0501$, $p=0,0257$, $R^2=0,2290$). На I стадии РТМ уровень NE значимо снижался в сравнении с контролем и миомой. При этом способность Нф генерировать АФК при РТМ I была связана со сниженным уровнем NE в сыворотке ($F(1.16)=6,2566$, $p=0,0236$, $R^2=0,2362$). Это свидетельствует об участии NE в поляризации Нф в сторону проопухолевого фенотипа со сниженной кислородзависимой цитотоксичностью при начальных стадиях РШМ и РТМ.

Ранее в работах Metzler K.D. et al. (2014) было указано, что АФК запускают диссоциацию NE из ассоциированного с мембраной комплекса в цитозоль и активируют её протеолитическую активность. По нашим данным при распространенном РТМ сывороточная NE значимо снижалась по сравнению с начальной стадией. При этом, в регрессионном анализе была выявлена связь МПО в Нф с уровнем NE в крови ($F(1.11)=5,6829$, $p=0,0362$, $R^2=0,2807$), что также подтверждает участие NE в поляризации Нф со сниженной миелопероксидазной цитотоксичностью при распространенном РТМ.

Таким образом, NE входит в NF-kB сигналинг при ДОЯ, циркулирующая NE влияет на адгезионные свойства Нф при РШМ, запускает дегрануляцию, апоптоз и NETos Нф при РЯ, снижает кислородзависимую цитотоксичность на начальных стадиях РШМ и РТМ.

6.10 – Регрессионный анализ взаимосвязи васкулоэндотелиального фактора роста и показателей циркулирующих нейтрофилов при прогрессировании рака яичников, шейки и тела матки

Известно, что путь NF-kB играет важную роль в передаче сигналов васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) и инвазии эпителиальной опухоли яичников [326]. NF-kB участвует в регуляции экспрессии мРНК VEGF [182]. В нашем исследовании повышенный в сравнении с контролем синтез VEGF Нф, в регрессионном анализе имел взаимосвязь с экспрессией NF-kB в Нф при РЯ ($F(1.59)=15,452$, $p=0,0002$, $R^2=0,1941$), что, вероятно, указывает на включение NF-kB и VEGF в один сигнальный путь в Нф.

Методом линейной регрессии была выявлена прямая зависимость экспрессии CD95 на Нф от уровня циркулирующего VEGF при РЯ I-II стадии ($F(1.15)=13,908$, $p=0,0020$, $R^2=0,4465$) и обратная - при миоме ($F(1.8)=18,678$, $p=0,0025$, $R^2=0,6626$), что свидетельствует об участии VEGF в поляризации Нф в сторону проопухолевого фенотипа при миоме.

Анти-VEGF-терапия снижает продукцию NETs при ретинопатии [170]. При распространенном РЯ была выявлена заметная прямая корреляционная связь ИЛ с уровнем VEGF-A в Нф ($r=0,6525$, $p=0,0018$), что подтверждает участие VEGF-A в функциональной активности NET. С использованием линейной регрессии при миоме была обнаружена взаимосвязь циркулирующего VEGF-A с количеством Нф, способных образовывать NET ($F(1.8)=22,814$, $p=0,0014$, $R^2=0,7079$), что указывает на поляризацию Нф в проопухолевый фенотип.

Полагают, что для усиления эффекта проангиогенных цитокинов Нф увеличивают экспрессию IL-8 [257]. При миоме матки мы выявили обратную корреляционную связь повышенного VEGF-A со сниженным по сравнению с контролем в Нф IL-8 ($r=-0,6647$, $p=0,0360$), что подтверждает участие IL-8 в проангиогенной функции Нф.

Повышение уровня VEGF-A в сыворотке ($F=5,19$, $p=0,0028$ (ANOVA)) и Нф ($F=159,90$, $p=0,0001$ (ANOVA)) связано с прогрессированием РТМ.

Таким образом, повышение сывороточного VEGF-A при миоме способствует вступлению Нф на путь NETоза и апоптоза. При РЯ внутриклеточный VEGF-A входит в NF- κ B-сигналинг и был ассоциирован с ИЛ. При патологии шейки матки и ДОЯ влияние VEGF-A на функциональное состояние Нф не обнаружено.

6.11 – Регрессионный анализ взаимосвязи матриксных металлопротеиназ, тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 и показателей нейтрофилов периферической крови пациентов при доброкачественных и злокачественных опухолях яичников и тела матки, в прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии

Сывороточные матриксные металлопротеиназы (MMPs) и тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ (TIMP-1) продуцируют активированные фибробласты [374], также Нф являются основным источником MMP-9 [41]. В нашем исследовании уровни MMP-1 в крови и в Нф коррелировали при миоме матки ($r=0,6565$, $p=0,0392$), при CIN ($r=0,5587$, $p=0,0011$). Уровень циркулирующего MMP-13 был ассоциирован с концентрацией MMP-13 в Нф при миоме ($r=0,9515$, $p=0,0001$), РЯ ($r=0,4582$, $p=0,0345$), при CIN ($r=0,8683$, $p=0,0001$). Для разнонаправленной динамики уровня MMP-13 в сыворотке крови и Нф при РТМ характерна обратная умеренная корреляционная связь ($r=-0,4933$, $p=0,0056$), что подтвердило ассоциацию циркулирующего MMP-13 с уровнем синтеза в Нф при исследуемых патологиях женской репродуктивной системы. Также была обнаружена умеренная обратная корреляционная связь между уровнем TIMP-1 в сыворотке крови и лизате Нф при РТМ ($r=-0,3695$, $p=0,0445$).

Таким образом, уровень MMP-13 в крови при миоме, РТМ, РЯ, CIN; MMP-1 - при миоме и CIN; TIMP-1 - при РТМ, ассоциированы с концентрацией одноименных цитокинов в Нф.

Известно, что MMPs - индуцируют высвобождение компонентов внеклеточного матрикса и облегчают миграцию Нф к месту воспаления, усиливают действие хемоаттрактантов для Нф - CXCL8 (IL-8) и CXCL5 (ENA-78) [161, 217, 59]. Методом линейной регрессии нами была обнаружена обратная зависимость NLR от MMP-1 крови при миоме матки ($F(1.8)=5,9073$, $p=0,0412$, $R^2=0,3528$), что может быть результатом участия MMP-1 в процессах воспаления при данной патологии.

Нф являются основным источником MMP-9, который участвует в пролиферации опухолевых клеток и снижении их апоптоза [38]. Под влиянием MMPs не запускается программа апоптоза, активно усугубляется воспаление, активируя неапоптотические сигнальные пути, включая пути NF- κ B и PI3K [227, 323]. Методом линейной регрессии нами выявлена взаимосвязь циркулирующего MMP-9 и количества CD95⁺Нф при ДОЯ ($F(1.13)=6,235$, $p=0,0267$, $R^2=0,2721$). При РТМ количество CD95⁺Нф связано с уровнем MMP-13 в крови ($F(1.8)=8,0183$, $p=0,0221$, $R^2=0,4381$). Это свидетельствует о том, что MMP-9 и MMP-13 прямо связаны с процессом апоптоза в Нф при ДОЯ и РТМ.

При ДОЯ нами была выявлена множественная регрессионная взаимосвязь циркулирующих MMP-9, MMP-1, MMP-13 с количеством активированных CD63⁺Нф ($F(3.11)=26,453$, $p=0,0002$, $R^2=0,8451$), что указывает на участие этих MMPs в поляризации Нф в противоопухолевый фенотип при ДОЯ. Выявленная зависимость количества циркулирующих Нф при миоме, способных к дегрануляции, от уровня сывороточного TIMP-1 ($F(1.8)=8,1394$, $p=0,0214$, $R^2=0,4423$), указывала на влияние TIMP-1 на активацию противоопухолевого фенотипа при миоме.

Таким образом, циркулирующие MMP-1, MMP-9, MMP-13, TIMP-1 при ДОЯ и миоме способствуют активации дегрануляции Нф, усиливая их

противоопухолевые функции. При злокачественных опухолях женской репродуктивной системы таких влияний не обнаружено.

В исследованиях была показана значимая корреляция между повышенной экспрессией VEGF и MMP-2 в тканях рака желудка у пациентов с метастазами, карциномой молочной железы, что подтверждает участие MMP-2 в инвазивности неоплазмы [360, 53]. При ДОЯ уровни MMP-2 и VEGF в Нф коррелировали между собой с заметной силой ($r=-0,6199$, $p=0,0275$). При РШМ повышенный VEGF-A прямо умеренно коррелировал с концентрацией MMP-2 в Нф ($r=0,3613$, $p=0,0085$), что подтверждает усиление проангиогенных функций Нф и участие MMP-2, синтезируемой гранулоцитами, в ангиогенезе и может способствовать прогрессированию РШМ. На участие MMPs и VEGF-A в ангиогенезе указывали также исследования Kozłowski M. et al (2013).

В работе Wang Y. et al. (2019) показано, что Нф - важный клеточный компонент опухолевого микроокружения, они индуцируют эпителиально-мезенхимальный переход клеток рака молочной железы с помощью TIMP-1. В свою очередь, клетки рака молочной железы, подвергшиеся эпителиально-мезенхимальному переходу, поддерживали и усиливали продукцию TIMP-1 Нф в клеточном контакте [348]. Нами была выявлена прямая регрессионная связь NF-kB Нф с повышенным уровнем в крови TIMP-1 при миоме и обратная при РТМ ($F(1.8)=5,9845$, $p=0,0402$, $R^2=0,3564$ и $F(1.28)=4,4843$, $p=0,0432$, $R^2=0,1073$, соответственно). Это свидетельствует о том, что только при миоме можно рассматривать включение TIMP-1 в NF-kB-сигналинг.

TIMP-1 колокализуется с MMP-8 и MMP-9 на активированных Нф человека и в NET [157]. Было обнаружено, что TIMP-1 обладает способностью уменьшать образование NET [42]. Методом линейной регрессии при миоме матки выявили обратную связь ЧЛ с MMP-2 в крови ($F(1.8)=5,4538$, $p=0,0478$, $R^2=0,3310$) и ассоциацию с концентрацией TIMP-1 в Нф ($r=0,7091$, $p=0,0217$), что, возможно, свидетельствует о влиянии циркулирующего MMP-2 на снижение способности к NETos и о связи внутриклеточного TIMP-1 с NET.

С активностью MMP-2 связана реорганизации цитоскелета злокачественных клеток, что облегчают отделение последних от первичной ткани [166]. При миоме матки повышенный уровень MMP-2 в крови обратно регрессионно связан со снижением ригидности мембраны Нф ($F(1.8)=11,920$, $p=0,0087$, $R^2=0,5482$), что указывает на участие MMP-2 в снижении противоопухолевых свойств Нф.

Таким образом, циркулирующий MMP-13 при миоме, РТМ, РЯ, CIN; MMP-1 при миоме и CIN; TIMP-1 при РТМ - ассоциированы с концентрацией одноименных цитокинов в Нф. Только при миоме циркулирующий MMP-1 влиял на NLR, демонстрируя участие в процессах воспаления. Уровни MMP-9 и MMP-13 в крови были взаимосвязаны с процессом апоптоза в Нф при ДОЯ и РТМ. Циркулирующие MMP-1, MMP-9, MMP-13, TIMP-1 при ДОЯ и миоме способствовали активации дегрануляции Нф, усиливая их противоопухолевые функции. Усиливал проангиогенные функции Нф внутриклеточный MMP-2 при РШМ. Было выявлено, что только при миоме внутриклеточный TIMP-1 входит в NF-kB-сигналинг и ассоциирован с NETos, а циркулирующий MMP-2 снижает ригидность и способность к NET-образованию.

Известно, что NF-kB Нф может способствовать индукции NET [263]. В нашем исследовании только при РЯ методом линейной регрессии была выявлена зависимость числа NET от экспрессии NF-kB ($F(1.59)=55,695$, $p=0,0001$, $R^2=0,4768$).

Таким образом, различные MMPs при различных локализациях опухоли женской репродуктивной системы влияют на различные параметры Нф. Только при CIN не было обнаружено влияние MMPs и TIMP-1 в чистом виде на функции Нф.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ**6-Й ГЛАВЫ**

Публикации в изданиях, рецензированных ВАК, и в международных реферативных базах данных Scopus и Web of Science

1. Влияние уровня провоспалительных цитокинов на образование внеклеточных нейтрофильных ловушек при распространенном раке яичников / Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, И.И. Антонеева, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг // Российский иммунологический журнал. 2019. Т.13 (22), № 2. С.704-706. (РИНЦ - 0.671).
2. Фенотип циркулирующих нейтрофилов на разных стадиях неоплазии шейки матки / Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева, С.О. Генинг, Д.Р. Долгова, А.Б. Песков, Т.П. Генинг // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 6. С. 1127-1138. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138 (РИНЦ - 0.740, Scopus).
3. The role of circulating neutrophils in the regulation of neoangiogenesis in ovarian cancer / T. Abakumova, S.Gening, T. Gening, D. Dolgova, I. Antoneeva // Annals of Oncology. 2019. Vol.30, Supplement 11. doi: 10.1093/annonc/mdz447|xi6 (WoS).
4. Abakumova, T. Pro-oncogenic status of circulating neutrophils in cervical intraepithelial neoplasia / T. Abakumova, S. Gening, T. Gening // Annals of Oncology. 2020. Vol. 31, suppl_5. S1217-S1239. doi: 10.1016/annonc/annonc321 (WoS).
5. CXCL8 and CCL2 production in circulating neutrophils in endometrial cancer / T. Abakumova, I. Antoneeva, S. Gening, T. Gening, D. Dolgova // Annals of Oncology. 2020. Vol. 31, suppl. 7. P. S1454. doi:10.1016/j.annonc.2020.10.581 (WoS).
6. IL-8 in circulating neutrophils as a potential biomarker in ovarian cancer / T. Abakumova, D. Dolgova, I. Myagdieva, T. Gening // European Journal of Clinical Investigation. 2020. Vol.50, Issue S1. Special Issue: ESCI Virtual Meeting 2020. COVID Edition. P.69. doi: 10.1111/eci.13369 (WoS).

7. Нейтрофилокины и морфофункциональное состояние циркулирующих нейтрофилов при опухолях яичников / Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, И.И. Антонеева, С.О. Генинг, В.В. Гноевых // Российский иммунологический журнал. 2021. Т.24, №3. С. 355-362. doi: 10.46235/1028-7221-985-NAT (РИНЦ - 0.671).
8. *Abakumova, T.* IL-17A and CCL2 in blood serum and circulating neutrophils in patients with ovarian tumors / *T. Abakumova, S. Gening, T. Gening* // J Clin Oncol. 2021. Vol.39, suppl 15; abstr e17536. doi:10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e17536 (WoS).
9. *Абакумова, Т.В.* Ангиогенный потенциал нейтрофилов циркулирующей крови при раке эндометрия / *Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, С.О. Генинг, И.И. Антонеева* // Медицинская иммунология. 2021. №2. С.317-322. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138 (РИНЦ - 0.740, Scopus).
10. *Abakumova, T.* CCL2 expression and the neutrophil plasma membrane characteristics in blood in different stages of endometrial cancer / *T. Abakumova, S. Gening, T. Gening* // Annals of Oncology. 2021. Vol 32, suppl_6. S1345-S1371. 10.1016/annonc/annonc740 (WoS).
11. *Abakumova, T.* CCL2 in Regulation of the Circulating Neutrophils Killing Capacity in the Uterine Body Tumors / *T. Abakumova, S. Gening, T. Gening* // European Journal of Clinical Investigation. 2021. Vol. 51, iss. S1. doi.org/10.1111/eci.13567 (WoS).
12. Extracellular traps of the circulating neutrophils in CIN and cervical cancer /*T. Abakumova, I. Antoneeva, S. Gening, A. Peskov, T. Gening* // Annals of Oncology. 2021. Vol. 32, suppl_5. S725-S772. 10.1016/annonc/annonc703 (WoS).
13. Влияние провоспалительных цитокинов на ригидность мембраны и морфофункциональное состояние циркулирующих нейтрофилов при опухолях яичников / *Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, С.О. Генинг, И.И. Антонеева, А.Б. Песков* // Медицинская иммунология. 2022. Т. 24, № 1. С. 1357-1366 (РИНЦ - 0.740, Scopus).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что фенотип и функции Нф изменяются во время опухолевой прогрессии, указывая на их гетерогенность. Поляризация в про- или противоопухолевый фенотип Нф связана с изменением концентрации циркулирующих цитокинов. В связи с этим, цель исследования - оценка количественно-функционального состояния циркулирующих нейтрофилов во взаимосвязи с цитокинами при прогрессировании злокачественных опухолей женской репродуктивной системы.

Чтобы это выяснить, обследовали пациенток с доброкачественными солидными опухолями яичников (ДОЯ) и матки, предраковыми заболеваниями и раке шейки матки (РШМ), раке яичников (РЯ) и раке тела матки (РТМ). Для сравнительной оценки исследованных показателей использовали группу контроля из 22 человек, которая не отличалась от групп с патологией женской репродуктивной системы по полу и по возрасту. Применены клинико-лабораторные методы, в частности, общеклинический, иммунологический, цитохимический, статистический. Дополнительными методами стали атомно-силовая микроскопия и оценка внеклеточных ловушек (NETs). Были получены данные о том, что разные группы интерлейкинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IFN γ , TNF α , G-CSF, MCP-1) и другие медиаторы (MMPs, TIMP-1, NE, VEGF) взаимосвязаны с морфо-функциональным состоянием Нф, и последние оказывают как протективное действие, так и препятствуют развитию патологического процесса.

Вопрос о том, происходит ли поляризация Нф вне или после инфильтрации опухоли остается актуальным в настоящее время. Циркулирующие цитокины и хемокины, продуцируемые как самой опухолью, так и клетками иммунной системы определяют про- (N2) и противоопухолевую активность (N1) Нф [36, 275]. Полагая, что N1 могут переходить в N2, авторы утверждают [304], что Нф не дифференцируются

окончательно. Пластичность последних в развитии рака требует переоценки их характеристик у онкологических больных.

Уже при ДОЯ установлены изменения циркулирующих в крови цитокинов, оказывающих влияние на функциональное состояние Нф. Повышенный уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке при ДОЯ по сравнению со здоровыми людьми (IL-17A, IL-8, VEGF, NE) и NLR свидетельствует о наличии признаков воспаления. Под влиянием коктейля циркулирующих TIMP-1, IL-2, MCP-1, IL-18 при ДОЯ повышается ригидность мембраны Нф (рисунок 39), Нф становятся способными к завершённому фагоцитозу, увеличению синтеза МПО и повышенной экспрессии CD11b.

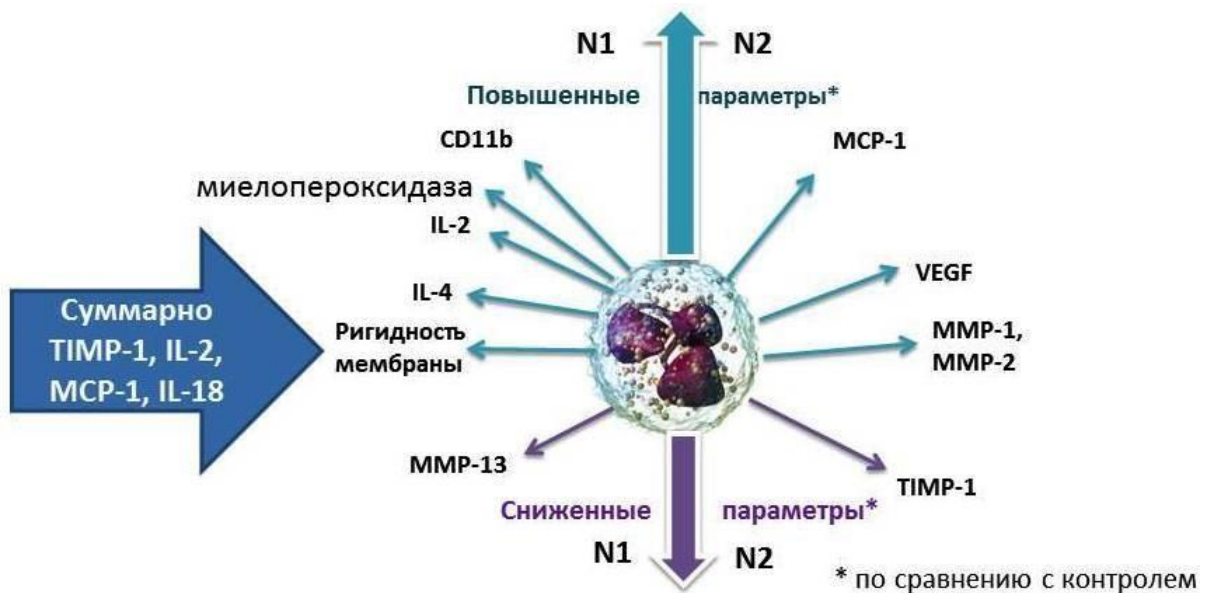


Рисунок 39 – Участие циркулирующих цитокинов в формировании N1 и N2 фенотипов при доброкачественных опухолях яичников (параметры N1 фенотипа слева, N2 - справа)

Примечание: MCP - моноцитарный хемотаксический протеин, N1 - противоопухолевый фенотип, N2 - проопухолевый фенотип, VEGF - васкулоэндотелиальный фактор роста.

Данные параметры, а также сниженная экспрессия NF-κB, IL-8, MMP-13, MMP-9 и повышенное содержание в Нф IL-2, IL-4, TIMP-1, установленная неспособность к повышенному образованию NET, ассоциированная со сниженной внутриклеточной экспрессией IL-18, может свидетельствовать о циркуляции Нф с супрессирующими опухоль свойствами. Таким образом, при

ДОЯ Нф обладают функциями, необходимыми для борьбы с атипичными клетками, и одновременно способными повреждать нормальные клетки яичника, способствуя росту неопластических клеток. В то же время сниженное содержание в Нф IL-1RA, IL-10 и повышенное G-CSF, IL-6, MCP-1, VEGF, MMP-1,-2 и NE, входящей в NF-kB-зависимый сигналинг (рисунки 40), свидетельствуют о проопухолевом потенциале Нф при ДОЯ. Ассоциация VEGF с экспрессией MMP-2 в Нф свидетельствует об ангиогенной функции Нф при ДОЯ.

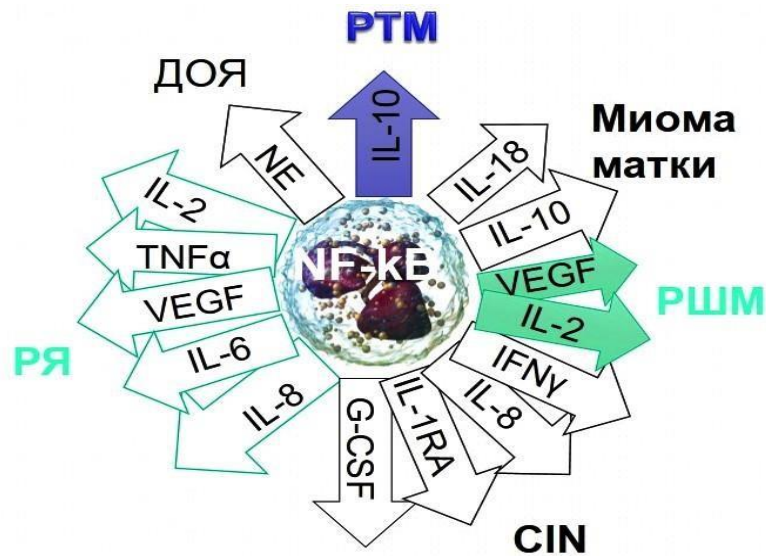


Рисунок 40 – Нейтрофилокины, входящие в NF-kB-сигналинг при опухолях женской репродуктивной системы

Примечание: ДОЯ - доброкачественные опухоли яичников, РТМ - рак тела матки, РЯ - рак яичников, CIN - цервикальная интраэпителиальная неоплазия.

Продуцируемые при развитии злокачественной опухоли яичника факторы способствуют увеличению выхода Нф в кровотоки и увеличению ими синтеза провоспалительных цитокинов, ангиогенных факторов и протеиназ.

На начальной стадии РЯ сохраняются повышенная ригидность мембраны и повышенная экспрессия CD11b. Нф при РЯ I-II стадии по сравнению с контролем способны к увеличенной продукции АФК и МПО, сниженной продукции IL-1 β , IL-18, IL-17A, IL-8, NE, повышенному содержанию IL-2, IL-4, IFN γ . Эти параметры характеризуют популяцию Нф с противоопухолевым фенотипом (рисунки 41).



Рисунок 41 - Участие циркулирующих цитокинов в формировании N1 и N2 фенотипов на разных стадиях рака яичников

Примечание: АФК - активные формы кислорода, MCP - моноцитарный хемотаксический протеин, MMP - матриксная металлопротеиназа, N1 - противоопухолевый фенотип, N2 - проопухолевый фенотип, VEGF - васкулоэндотелиальный фактор роста, TIMP - тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ.

Однако имеет место сниженная способность к экспрессии CD95, неспособность к завершеному фагоцитозу, повышенная способность образовывать NET и их сниженный индекс под влиянием IL-10. Также повышенная экспрессия NF-kB, G-CSF, IL-6, MCP-1, VEGF, сниженная способность к содержанию TNF α свидетельствуют о поляризации Нф в сторону проопухолевого фенотипа (рисунок 41).

Увеличение NLR на III стадии РЯ сопровождается увеличением количества CD11b⁺, CD63⁺, CD95⁺Нф и количества Нф, активных в индуцированном НСТ-тесте, с повышенным синтезом МПО и содержанием IL-2, IL-4. При этом экспрессия IL-1 β , IL-17A, IL-18 в Нф снижается; выявляется способность к завершеному фагоцитозу. Эти параметры характеризуют популяцию Нф, способных к опухолевой супрессии. Под влиянием коктейля сывороточных цитокинов - IL-17A, IL-6, VEGF, NE, TNF α ,

IL-2, повышается способность Нф к образованию NET (*рисунок 41*). Также у этой популяции снижена способность к синтезу IFN γ , повышена экспрессия NF-kB, G-CSF, MCP-1, VEGF, NE, что характеризует ее проопухолевые свойства.

При распространенном РЯ N1 популяция характеризуется повышенной экспрессией CD11b, IL-2, IL-4, IFN γ и сниженной экспрессией CD16, IL-1 β , IL-17A, IL-18, IL-10 в Нф. Однако под влиянием повышенного IL-10 сыворотки снижается генерация АФК и содержание МПО, что способствует поляризации N2-подобных Нф. Также Нф проопухолевого фенотипа обладают повышенной способностью к NET образованию и сниженной киллинговой функцией, снижению синтезу IL-10, и повышенной экспрессией NF-kB, G-CSF, IL-8, MCP-1, VEGF, NE.

Возможно, что NF-kB участвует в поляризации Нф при РЯ в сторону проопухолевого фенотипа, так как увеличение экспрессии NF-kB ведет к повышению синтеза в Нф IL-6, IL-8, VEGF-A, TNF α (*рисунок 40*), и усилению NETos. Киллинговая функция NET ассоциирована с уровнем MCP-1, IFN γ , TNF α в Нф. Корреляционные связи VEGF с IL-6, IL-8, IL-18 свидетельствуют об участии этих цитокинов в усилении ангиогенных свойств Нф.

Вероятность возникновения РЯ возрастает при повышенном уровне IL-1 β (более 1,697 пг/мл), и одновременно сниженных уровнях в сыворотке крови G-CSF (менее 0,749 пг/мл) и IL-17A (менее 52,796 пг/мл), при одновременно повышенном уровне МПО (более 2,60 СЦК) и АФК (более 1,08 СЦК) в Нф, и сниженном уровне IFN γ (менее 4,525 пг/мл) в Нф.

Таким образом, результаты, полученные методом множественной и линейной регрессии, позволяют выявить коктейли сывороточных и единичные цитокины, а также факторы, которые находятся в NF-kB зависимом сигналинге, поляризующие циркулирующие Нф в про- и противоопухолевые популяции в системном кровотоке при ДОЯ и РЯ. Маркерами при дифференциальной диагностике РЯ и ДОЯ могут служить - IL-1 β , G-CSF и IL-

17А в сыворотке крови; также активность МПО, $IFN\gamma$ в Нф и их активность в НСТ-тесте;

Выявлено, что сниженный NLR ассоциирован с повышенными в сыворотке уровнями $IL-1\beta$, $IL-10$, $IFN\gamma$ при CIN, что свидетельствует об участии этих циркулирующих цитокинов в системном воспалении. При этом увеличивается количество Нф, экспрессирующих CD11b с повышенным уровнем МПО и АФК, $IL-2$, $TNF\alpha$, $IL-4$, $IFN\gamma$, TIMP-1 и сниженным уровнем MMP-13. Такие Нф формируют популяцию противоопухолевых Нф (рисунок 42).

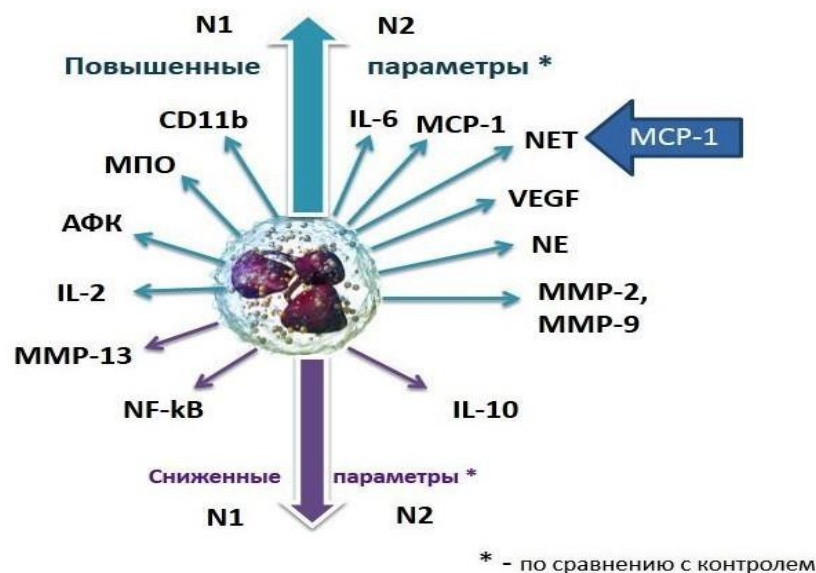


Рисунок 42 – Участие циркулирующих цитокинов в формировании N1 и N2 фенотипов при CIN (параметры N1 фенотипа слева, N2 - справа)

Примечание: АФК - активные формы кислорода, МПО - миелопероксидаза, МСР - моноцитарный хемотаксический протеин, MMP – матриксная металлопротеиназа, N1 - противоопухолевый фенотип, N2 - проопухолевый фенотип, NE - нейтрофильная эластаза, NF-kB - ядерный фактор-каппа В, VEGF - васкулоэндотелиальный фактор роста.

Проопухолевые Нф при CIN не способны к завершённому фагоцитозу, но способны к повышенному образованию NET под влиянием МСР-1 в 30% случаев. Такие Нф усиленно увеличивают продукцию G-CSF, $IL-6$, МСР-1, VEGF, NE, MMP-1, MMP-2, MMP-9, и снижают синтез $IL-10$, $IL-1RA$ (рисунок 42). Также при CIN внутриклеточный уровень $IL-8$ ассоциирован со

способностью образовывать NET, а IL-1 β и TNF α усиливают ангиогенные свойства Нф.

Нами обнаружено, что на начальной стадии РШМ под влиянием сывороточного MCP-1 в Нф увеличивается синтез МПО (рисунок 43), что способствует поляризации Нф в сторону противоопухолевого фенотипа. Эта субпопуляция Нф характеризуется повышенным синтезом IL-1RA, IL-2, TNF α , IL-4, IL-10 и сниженным содержанием IL-8, IL-18, G-CSF. Однако, под действием коктейля сывороточных цитокинов (IFN γ , IL-10, IL-6, TNF α , IL-4) (рисунок 43) увеличивается экспрессия NF-kB, что указывает на участие этих цитокинов в поляризации N2.

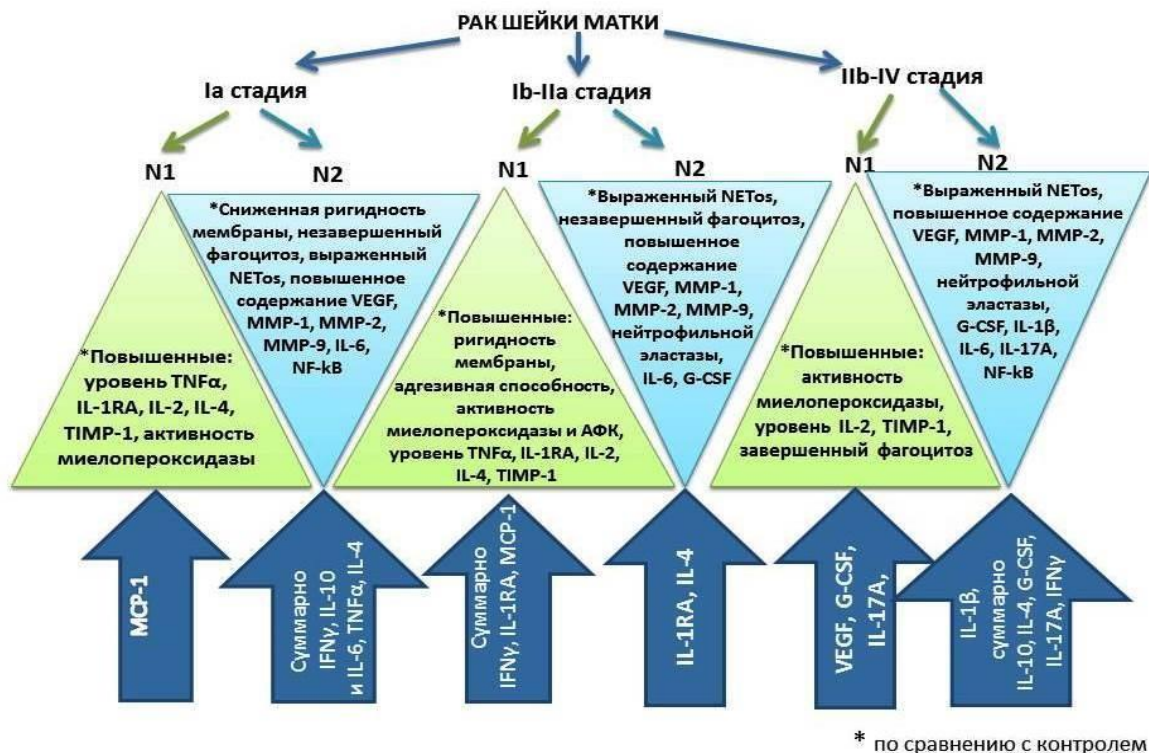


Рисунок 43 – Участие циркулирующих цитокинов в формировании N1 и N2 фенотипов на разных стадиях рака шейки матки

Примечание: АФК - активные формы кислорода, IFN – интерферон, MCP – моноцитарный хемотаксический протеин, MMP – матриксная металлопротеиназа, N1 - противоопухолевый фенотип, N2 - проопухолевый фенотип, NET - внеклеточные нейтрофильные ловушки, NF-kB - ядерный фактор-каппа В, TNF - фактор некроза опухоли, VEGF - васкулоэндотелиальный фактор роста, TIMP – тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ.

Также для проопухолевых Нф при РШМ Ia стадии характерны повышенные уровни MCP-1, VEGF, NE, IL-6, сниженная кислородзависимая

цитотоксичность, ригидность мембраны и способность к фагоцитозу, но повышенная способность к образованию NET. Ассоциация уровня внутриклеточных TNF α , IL-2 и IL-8 с повышенным VEGF в Нф подтверждает участие этих цитокинов в усилении проангиогенных функций Нф на начальной стадии РШМ.

В нашем исследовании при местноограниченном РШМ под влиянием коктейля цитокинов (IFN γ , IL-1RA, MCP-1) (*рисунок 43*) увеличивается количество CD11b⁺Нф, с повышенной ригидностью мембраны и содержанием МПО, IL-1RA, IL-4, TNF α и IL-2, находящегося под влиянием NF-kB. Проопухолевый фенотип формируется под влиянием сывороточных IL-1RA, IL-4 (*рисунок 43*), влияющих на снижение цитотоксичности Нф. Также эти Нф не способны к завершеному фагоцитозу, но в них повышена способность к NET образованию и экспрессия NF-kB, VEGF, NE, G-CSF, IL-6. Корреляционная связь IL-8 с VEGF в Нф свидетельствует о роли IL-8 в усилении проангиогенных функций Нф.

При распространенном РШМ повышение сывороточных NE, IL-1RA, MCP-1 связано с увеличением NLR, что свидетельствует о связи этих цитокинов с опухолеассоциированным воспалением.

Регрессионный анализ позволяет установить влияние сывороточных VEGF, IL-17A, G-CSF на завершенность фагоцитоза при распространенном РШМ. На этой стадии процесса в Нф повышено содержание МПО, IL-2, TNF α , IFN γ , и снижено IL-18, IL-8. Под влиянием циркулирующих цитокинов IL-10, IL-4, G-CSF, IL-17A, IFN γ (*рисунок 43*) активизируется NF-kB Нф, что способствует поляризации Нф в сторону проопухолевого фенотипа. N2-подобные Нф не способны к завершеному фагоцитозу, но была увеличена способность к образованию NET и низкая киллинговая активность последних. А под влиянием IL-1 β снижается цитотоксичность Нф (*рисунок 43*). Также в этих Нф повышен уровень IL-1 β , IL-17A, G-CSF, IL-6, MCP-1, VEGF, NE, и снижен уровень IL-10, IL-4. Повышение в Нф уровня G-CSF, IL-1 β , IL-17A, IL-2, TNF α и снижение IL-8, IL-10, IL-4 ассоциировано с усилением активности

VEGF в Нф, что указывает на влияние этих цитокинов на проопухолевую активность Нф.

При РШМ в Нф повышенный уровень MMP-1, MMP-2, MMP-9 определяет проопухолевые, а сниженный MMP-13 и повышенный TIMP-1 - противоопухолевые свойства. Способность образовывать NET и их киллинговая активность коррелирует с уровнем NE, G-CSF, IL-6, TNF α в Нф, а IL-4, IL-10, IL-2, IL-17A, IL-8, IL-18, MMP-2 и TIMP-1 в Нф ассоциированы с их ангиогенной активностью.

Риск возникновения РШМ возрастает при сниженных уровнях G-CSF (менее 33,937 пг/мл) и IFN γ (менее 9,137 пг/мл), и одновременно повышенном в сыворотке крови уровне IL-2 (более 3,991 пг/мл), при сниженных уровнях IL-8 (менее 108,694 пг/мл) и ИЛ (менее 1,8 у.е.), и одновременно повышенном уровне в Нф NE (более 0,817 нг/мл).

Таким образом, результаты, полученные методом множественной и линейной регрессии, позволяют выявить коктейли и единичные сывороточные цитокины, поляризующие Нф в про- и противоопухолевые популяции в системном кровотоке при РШМ. Также определены нейтрофилокины, входящие в NF- κ B-зависимый сигналинг и ассоциированные со способностью образовывать NET и проангиогенной активностью. Маркерами при дифференциальной диагностике РШМ и CIN могут служить - G-CSF, IL-2 и IFN γ в сыворотке крови; также активность NE, IL-8 в Нф и ИЛ.

Установлено, что при миоме NLR регрессионно связано циркулирующими NE и MMP-1. Ригидность мембраны Нф, находящаяся в пределах нормы, связана с циркулирующей MMP-2. Увеличение количества CD11b⁺Нф зависит от циркулирующего TNF α , а CD63⁺Нф - от TIMP-1 (рисунок 44).

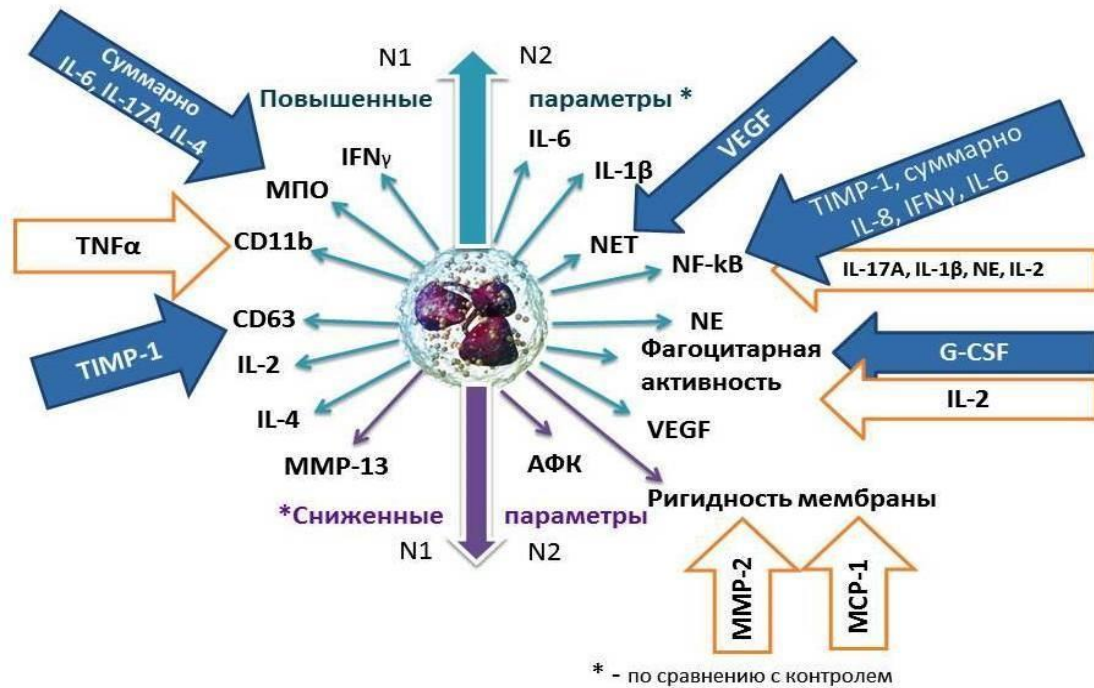


Рисунок 44 – Участие циркулирующих цитокинов в формировании N1 и N2 фенотипов при миоме матки (параметры N1 фенотипа слева, N2 - справа)

Примечание: АФК - активные формы кислорода, МПО - миелопероксидаза, G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, MMP – матриксная металлопротеиназа, N1 - противоопухолевый фенотип, N2 - проопухолевый фенотип, NET - внеклеточные нейтрофильные ловушки, NF-kB - ядерный фактор-каппаВ, TIMP – тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ, TNF - фактор некроза опухоли, VEGF - васкулоэндотелиальный фактор роста.

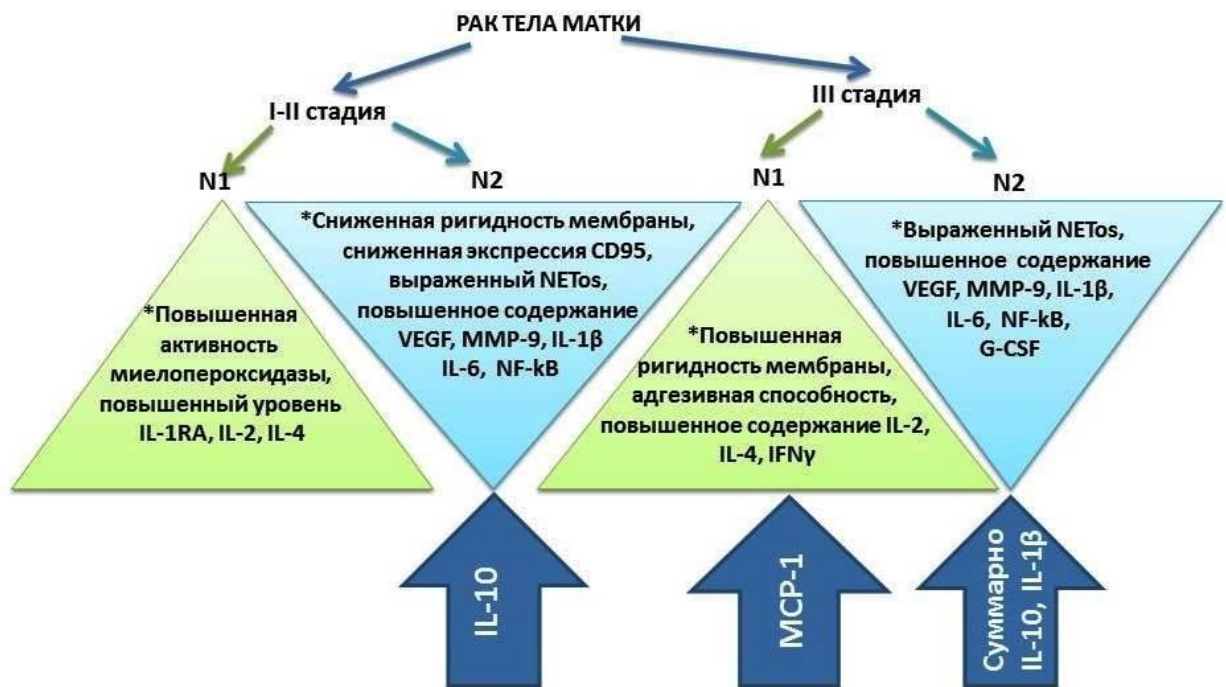
Уровень циркулирующих цитокинов (IL-6, IL-17A, IL-4) в модели линейной регрессии связан с повышенным содержанием МПО в Нф, что характерно для N1-подобных Нф. Противоопухолевый фенотип Нф при миоме матки также определяется повышенным внутриклеточным уровнем IL-2, IL-4, IFN γ , и сниженным уровнем IL-8, IL-17A, MMP-13, IL-18, которые находятся в зависимости от экспрессии NF-kB (*рисунок 40*). Повышенная экспрессия NF-kB в Нф регрессионно связана с коктейлем цитокинов (IL-8, IFN γ , IL-6), а также с уровнями циркулирующих цитокинов IL-1 β , IL-17A, NE, IL-2.

В Нф проопухолевого фенотипа повышен уровень IL-1 β , G-CSF, IL-6, VEGF, NE, MMP-9, снижен уровень IL-1RA, IL-10. Последний находится в зависимости от уровня NF-kB (*рисунок 40*).

N2-подобные Нф под влиянием циркулирующих G-CSF и IL-2 при миоме не способны к завершённому фагоцитозу и имеют сниженную

цитотоксичность. Однако, ЧЛ и ИЛ значимо повышенные регрессионно связаны с уровнем циркулирующего VEGF. ЧЛ ассоциировано с уровнем TIMP-1 в Нф, а ИЛ - с уровнем IL-2 в Нф (рисунок 44).

На I стадии РТМ выявлена обратная регрессионная зависимость количества CD95⁺Нф от повышенного уровня IL-10 в крови, что подтверждает участие циркулирующего IL-10 в поляризации Нф в сторону проопухолевого фенотипа (рисунок 45). Цитотоксичность таких Нф была снижена, но увеличена способность к NET образованию с низким ИЛ. Также повышенный в Нф уровень IL-1 β , G-CSF, IL-6, MCP-1, VEGF, NF-kB и сниженный уровень TNF α , IL-10 свидетельствуют о проопухоловом фенотипе Нф.



* по сравнению с контролем

Рисунок 45 – Участие циркулирующих цитокинов в формировании N1 и N2 фенотипов на разных стадиях рака тела матки

Примечание: G-CSF - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, MCP - моноцитарный хемотаксический протеин, MMP – матриксная металлопротеиназа, N1 - противоопухолевый фенотип, N2 - проопухолевый фенотип, NET - внеклеточные нейтрофильные ловушки, NF-kB - ядерный фактор-каппаВ, VEGF - васкулоэндотелиальный фактор роста.

При РТМ I стадии не выявлены сывороточные цитокины, связанные с повышенной ригидностью Нф, МПО и способностью к завершённому фагоцитозу.

На II-III стадии РТМ увеличивается количество CD11b⁺Нф с повышенной ригидностью мембраны. Регрессионный анализ позволяет установить связь сывороточного MCP-1 с завершенностью фагоцитоза Нф. В N1-подобных Нф при распространенном РТМ был повышен уровень IL-2, IL-4, IFN γ , снижен IL-17A, IL-18, IL-8. N2-подобные Нф способны к повышенному NET образованию и сниженной экспрессии CD95. От коктейля сывороточных IL- β и IL-10 зависит повышенная экспрессия NF-kB. Нф имеют повышенный уровень IL-1 β , G-CSF, IL-6, MCP-1, VEGF, и пониженный TNF α и IL-10. Последний входил в NF-kB-зависимый сигналинг (*рисунок 40*). На всех стадиях РТМ Нф были с высоким содержанием MMP-9 и низкой концентрацией MMP-13.

Обнаружено, что в Нф IL-8 при миоме и IL-17A при РТМ ассоциированы с уровнем VEGF, что указывает на роль IL-8 и IL-17A в проангиогенной функции Нф.

Риск возникновения РТМ возрастает при одновременно повышенных уровнях IL-1RA (более 284,22 пг/мл) и IL-6 (более 13,45 пг/мл) или MCP-1 (более 255,14 пг/мл) в сыворотке крови, а также при одновременно повышенных уровнях MCP-1 (более 20,147 пг/мл) в циркулирующих Нф и сниженной способности захватывать частица с помощью NET (менее 1,32 у.е.).

Таким образом, при использовании методов множественной и линейной регрессии выявлены коктейли и единичные сывороточные цитокины участвующие в поляризации в N1 и N2-подобных Нф при миоме и на разных стадиях РТМ, внутриклеточные цитокины, входящие в NF-kB-зависимый сигналинг. Выявлены нейтрофилокины, ассоциированные с ангиогенной функцией и NETos. Маркерами при дифференциальной диагностике РТМ и миомы могут служить - IL-1RA и IL-6/MCP-1 в сыворотке крови; также активность MCP-1 в Нф и ИЛ.

Опухолеассоциированное воспаление сопровождается выработкой различных типов хемокинов и цитокинов. Провоспалительная функция Нф

регулируются NF- κ B, который является центральным фактором транскрипции и изменяет в Нф экспрессию генов цитокинов. Нами выявлено влияние циркулирующих цитокинов при различных локализациях гинекологического рака на экспрессию ядерного NF- κ B в Нф. Следовательно, таргетное ингибирование специфической экспрессии генов этого сигнального пути может является мишенью для предотвращения опухолеассоциированного воспаления.

Поляризация Нф в проопухолевый фенотип имеет место для РЯ и РТМ уже при доброкачественных опухолях и на стадии CIN.

Каждая изученная локализация опухоли характеризуется индивидуальным коктейлем цитокинов, способствующих поляризации N2.

Понимание потенциальной роли «перепрограммированных опухолью» Нф необходимо для разработки методов лечения рака. При этом, цитокины регулирующие функции Нф, являются потенциальными терапевтическими мишенями для модулирования этих функций.

ВЫВОДЫ

1. Цитокины периферической крови могут определять праймирование нейтрофилов и участие ядерного фактора-каппаВ (NF-kB) в регуляции продукции нейтрофилокинов: нейтрофильная эластаза (NE) при доброкачественных опухолях яичников, IL-6, IL-8, фактора некроза опухоли (TNF α) при раке яичников, IL-2 при раке шейки матки, IL-18, IL-10 при миоме матки, IL-10 при раке тела матки.

2. Выявлена взаимосвязь циркулирующих цитокинов с повышением ригидности и адгезионных свойств мембраны нейтрофилов: при доброкачественных опухолях яичников - тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ-1 (TIMP-1), IL-2, IL-18, моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1), на начальных стадиях рака яичников - IL-17A и IL-10, при раке шейки матки - суммарно IFN γ , IL-1RA, MCP-1 и NE, при миоме матки - MCP-1 и матриксная металлопротеиназа-2 (MMP-2), а также NE, о чем свидетельствует коэффициент линейной регрессии.

3. Цитокины крови могут определять способность нейтрофилов к фагоцитозу: при доброкачественных опухолях яичников - IL-10, при раке яичников - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), IL-2, MMP-13 и на начальных стадиях - IL-6, при раке шейки матки – суммарно IL-4, IL-10, IL-18, G-CSF, NE, VEGF, а также IL-1 β , IL-6, MCP-1, G-CSF, при миоме матки - IL-17A и NE, при раке тела матки - MCP-1, о чем свидетельствует модель линейной регрессии.

4. На повышение дегрануляции нейтрофилов могут влиять циркулирующие цитокины: при доброкачественных опухолях яичников – суммарно MMP-1, MMP-9, MMP-13, при раке яичников – суммарно G-CSF и NE, при раке шейки матки – IL-1 β , IL-2, IL-17A, при миоме матки - TIMP-1, при раке тела матки - IL-18, о чем свидетельствует коэффициент регрессионной взаимосвязи этих параметров.

5. Методом линейной регрессии выявлено цитокиновое микроокружение, которое может определять цитотоксичность нейтрофилов: при доброкачественных опухолях яичников – IL-1RA, при раке яичников – суммарно G-CSF и IL-10, а также IL-8, при местноограниченном раке шейки матки – IL-1RA, при распространенном раке шейки матки IL-1 β , при миоме матки – суммарно IL-4, IL-6, IL-17A, а также IFN γ , при раке тела матки - IL-6, NE, IL-18.

6. Циркулирующие цитокины могут способствовать вступлению нейтрофилов на путь апоптоза: при доброкачественных опухолях яичников – MMP-9 и IL-8, при распространенном раке яичников – суммарно IL-1RA, IL-2, NE, при местноограниченном раке шейки матки – IL-1RA, при миоме матки – VEGF, MMP-13, NE, что подтверждается в модели линейной регрессии.

7. Регрессионный анализ показал взаимосвязь цитокинов периферической крови и способности нейтрофилов к NETos: при раке яичников – IL-2, IL-6, IL-17A, TNF α , VEGF, NE, при дисплазии - MCP-1, при миоме матки – VEGF, MMP-2, при начальных стадиях раке тела матки - IL-2 и VEGF.

8. Корреляционный анализ показал связь нейтрофилокинов с ангиогенным фактором гранулоцитов: при доброкачественных опухолях яичников – MMP-2, при раке яичников – IL-6, G-CSF, при цервикальной интраэпителиальной неоплазии - IL-1 β , TNF α , при раке шейки матки - IL-4, IL-10, IL-2, IL-17A, IL-8, IL-18, MMP-2 и TIMP-1, при миоме матки- IL-8, при раке тела матки - IL-17A.

9. Внутриклеточные цитокины ассоциированы с киллинговой активностью NET: при доброкачественных опухолях яичников – IL-18, при раке яичников – MCP-1, IFN γ , TNF α , а также NF-kB, при цервикальной интраэпителиальной неоплазии - IL-8, IL-1 β , при раке шейки матки - NE, G-CSF, IL-6, TNF α , при миоме матки- IL-2, TIMP-1, при раке тела матки - IL-17A.

10. Маркерами дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей яичников может служить предложенный перечень

параметров - уровень IL-1 β , G-CSF и IL-17A сыворотки, и активность МПО, АФК, IFN γ в нейтрофилах; рака шейки матки и дисплазии - уровень G-CSF, IFN γ , IL-2 в сыворотке крови, а также IL-8, NE и индекс ловушек нейтрофилов; рака тела и миомы матки - уровень IL-1RA, IL-6/MCP-1 в сыворотке крови, а также MCP-1 и индекс ловушек циркулирующих нейтрофилов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В практике онкоиммунологии для оценки вероятности 97,6% развития рака яичника могут быть использованы: уровень IL-1 β , G-CSF и IL-17A в сыворотке крови, и при значениях IL-1 β более 1,697 пг/мл, G-CSF менее 0,749 пг/мл и IL-17A менее 52,796 пг/мл можно предположить развитие рака яичников.

2. Оценить риск развития рака яичника возможно по значениям уровня миелопероксидазы (более 2,60 СЦК) и IFN γ (менее 4,525 пг/мл) в нейтрофилах, и активности последних в НСТ-тесте (более 1,08 СЦК) с вероятностью 95,1%.

3. Чтобы оценить риск возникновения рака шейки матки, необходимо определить уровень G-CSF, IL-2 и IFN γ в сыворотке крови, и при значениях G-CSF менее 33,937 пг/мл и IFN γ менее 9,137 пг/мл, а также одновременно повышенном уровне IL-2 (более 3,991 пг/мл) можно предположить развитие рака шейки матки с вероятностью 96.2%.

4. Возникновение рака шейки матки при значении индекса ловушек (менее 1,8 у.е.) и уровню нейтрофилокинов IL-8 (менее 108,694 пг/мл) и нейтрофильной (более 0,817 нг/мл) возможно с вероятностью 100%.

5. Для оценки риска возникновения рака тела матки необходимо определить концентрации IL-1RA и IL-6/MCP-1 в сыворотке крови, MCP-1 в лизате нейтрофилов и величины индекса ловушек. При значениях IL-1RA более 284,22 пг/мл, IL-6 более 13,45 пг/мл / MCP-1 более 255,14 пг/мл в сыворотке можно диагностировать рак тела матки с вероятностью с

96.2%/88.5%, а при уровне МСР-1 более 20,147 пг/мл в циркулирующих нейтрофилах, а также индексе ловушек менее 1,32 у.е. – с вероятностью 96 %.

6. Определение в сыворотке крови уровней цитокинов, влияющих на активацию NF-κB, цитотоксичность нейтрофилов и эффекторы NF-κB-сигнального пути в нейтрофилах: нейтрофильная эластаза - при доброкачественных опухолях яичников, TNFα - при раке яичников I-II стадии, IL-2 – при раке шейки матки на Ib-IIa стадии, IL-18, IL-10 - при миоме матки, IL-10 - при распространенном раке тела матки, позволяют оценить наличие опухолеассоциированного воспаления.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЗКЦ - антителозависимая клеточная цитотоксичность

АПК – антигенпрезентирующая клетка

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АФК – активные формы кислорода

ДОЯ – доброкачественные опухоли яичников

ИЗФ – индекс завершеного фагоцитоза

ИЛ - индекс ловушек

ММР – матриксная металлопротеиназа

МПО – миелопероксидаза

НСТ – нитросиний тетразолий

Нф – нейтрофилы

РТМ – рак тела матки

РШМ – рак шейки матки

РЯ – рак яичников

СЦК – средний цитохимический коэффициент

ФИ – фагоцитарный индекс

ФЧ – фагоцитарное число

ЧЛ - число ловушек

CD – кластер дифференцировки

CIN - цервикальная интраэпителиальная неоплазия

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

IFN - интерферон

IL – интерлейкин

N1 – противоопухолевые нейтрофилы

N2 – проопухолевые нейтрофилы

NE - нейтрофильная эластаза

NET - neutrophil extracellular traps

NF-κB – ядерный фактор - каппа В

NLR - нейтрофильно-лимфоцитарное отношение

NO – оксид азота

MCP - моноцитарный хемоаттрактант

TAN – опухолеассоциированные нейтрофилы

TIMP - тканевый ингибиторматриксных металлопротеиназ

TNF – фактор некроза опухоли

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверьянов, А.В. Роль нейтрофильной эластазы в патогенезе хронической обструктивной болезни лёгких / А.В. Аверьянов // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т.6, № 4. – С. 3–8.
2. Барсук, А.В. Активация нейтрофильных лейкоцитов периферической крови у больных острым панкреатитом / А.В. Барсук, В.В. Нарсия, А.А. Славинский // Современные наукоемкие технологии. – 2012. - №8. – С.8-9.
3. Блиндарь, В.Н. Современное представление о роли нейтрофилов в противоопухолевом иммунитете (обзор литературы) / В.Н. Блиндарь, Г.Н. Зубрихина // Клиническая лабораторная диагностика — 2005. — № 8. — С. 51–54.
4. Буянова, С.Н. Современные аспекты роста миомы матки / С.Н.Буянова, Н.В. Юдина, С.А. Гукасян, М.В. Мгелиашвили // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2012. - №4. – С.42-48.
5. Возможности иммунотерапии при раке яичников / И.Ж. Шубина, А.Н. Грицай, Л.Т. Мамедова, и др. // Опухоли женской репродуктивной системы. - 2013. - №4. - С.110-113.
6. Герасимов, И.Г. Морфология нейтрофилов крови человека в процессе их фагоцитоза *in vitro* / И.Г. Герасимов, Т.М. Гальбурт // Вестник Донецкого национального университета. – 2009. - №1. – С.377-382.
7. Гетажеев, К.В. Миома матки. Патогенетические основы и профилактика (обзор литературы) / К.В. Гетажеев, И.А. Тебиев // Молодой ученый. - 2019. - №27. - С. 60-61.
8. Данилова, А.Б. Нейтрофилы как компонент опухолевого микроокружения / А.Б. Данилова, И.А. Балдуева // Вопросы онкологии. - 2016. - Т.62, №1. – С. 35-44.
9. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты / И.В. Нестерова, С.В. Ковалева, Г.А. Чудилова, и др. // Иммунология. – 2012. - №35(5). – С.281-288.

10. Долгушин, И.И. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети ДНК сдерживают рост опухолевых клеток / И.И. Долгушин, Ю.С. Шишкова, А.Б. Кузнецова // Российский иммунологический журнал. - 2013. – Т.7(16), № 2-3. – С.130.
11. Зароченцева, Н.В. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии: современный взгляд на проблему и пути решения / Н.В. Зароченцева, Л.К. Джиджихия // Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения. – 2016. - № 4. - С.92-101.
12. Клинические рекомендации: Рак тела матки и саркомы матки / под ред. А.Д. Каприна. Москва, 2020. https://old.oncology-association.ru/files/clinical-guidelines-2020/rak_tela_matki_i_sarkomy_matki.pdf
13. Клинические рекомендации: Рак яичников / рак маточной трубы / первичный рак брюшины / под ред. А.Д. Каприна. Москва, 2020. https://old.oncology-association.ru/files/clinical-guidelines-2020/rak_jaichnikov_matochnoj_truby.pdf
14. Коваленко, Е.И. Влияние пероксида водорода на способность нейтрофилов генерировать активные формы кислорода и хлора и секретировать миелопероксидазу *in vitro* / Е.И.Коваленко, Г.Н. Семенкова, С.Н. Черенкевич // Цитология. — 2007. — Т. 49, № 10. — С. 839—847.
15. Кокряков, В.Н. Очерки о врожденном иммунитете / В.Н. Кокряков. – Санкт-Петербург: Наука, 2006. – 260с.
16. Кравцов, А.Л. Секреторная дегрануляция нейтрофилов, как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых лейкоцитарных протеаз и протеолитически-активных рецепторов / А.Л. Кравцов, Т.П. Шмелькова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. - №1. – С.79-87.
17. Мальцева, В.Н. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли / В.Н. Мальцева, В.Г. Сафронова // Цитология. - 2009. - Т. 51, № 6. - С. 467-474.
18. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: Т.2 / под ред. проф. А.И. Карпищенко. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 3-е изд. - 792 с.

19. Москалев, А.В. Роль нейтрофильных гранулоцитов в иммуновоспалительном процессе / А.В. Москалев, А.С. Рудой, А.В. Апчел, А.Б. Шангин // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2016. - №4(56). – С. 191-195.
20. Нарушения реструктуризации хроматина ядер и фенотипические особенности нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке / И.В. Нестерова, С.В. Ковалева, А.А. Евглевский, и др. // Российский аллергологический журнал. – 2011. – № 4, вып.1. – С. 253–255.
21. Нейтрофилы как цитокинпродуцирующие клетки / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, и др. // Российский иммунологический журнал. - 2019. - Т. 13(22), №4. - С. 1469-1471.
22. Нестерова, И.В. Нейтрофильные гранулоциты - ключевые клетки иммунной системы / И.В. Нестерова, И.Н. Швыдченко, В.А. Роменская //Аллергология и иммунология. – 2008. – Т.9, №4. – С.432-435.
23. Нестерова, И.В. Особенности трансформации фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64 (-) CD32(+)/CD16(+)/CD11b(+) и CD64(+)/CD32(+)/CD16(+)/CD11b(+) пациентов с колоректальным раком под влиянием Г-КСФ, ИФН α и ИФН γ в системе *in vitro* / И.В. Нестерова, С.В. Ковалева, Г.А. Чудилова // Аллергология и иммунология. - 2011. - Т. 12, №3. - С. 265-268.
24. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньшикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, и др. - Москва: Слово, 2006. - 553 с.
25. Особенности спонтанной и индуцированной реструктуризации хроматина и функционирования кислородзависимых цитотоксических механизмов нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке / И.В. Нестерова, А.А. Евглевский, Е.В. Фомичева, и др. // Российский иммунологический журнал – 2011. – Т.5(14), № 3–4. – С. 254 – 261.
26. Особенности фенотипа нейтрофильных гранулоцитов при неопластических процессах / И.В. Нестерова, С.В. Ковалева, Г.А. Чудилова, и др. // Российский иммунологический журнал. — 2010. — Т. 4 (13), № 4. — С. 374—380.

27. Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллера C60 / Л.А. Шарафутдинова, Е.Н. Горшкова, И.И. Садрутдинова, и др. // Биомедицина. – 2014. - № 3. – С.49-53.

28. Периоперационная иммунокоррекция галавитом у онкологических больных / С.П. Свиридова, З.Г. Кадагидзе, В.Н. Блиндарь, и др. // Вестник интенсивной терапии. - 2007. - № 4. - С. 16—21.

29. Петров, Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 608 с.

30. Плескова, С.Н. Исследование механизмов клеточной гибели методом атомно-силовой микроскопии / С.Н. Плескова, Э.Р. Михеева, Е.Е. Горностаева // Современные достижения бионаноскопии: сб. тезисов восьмой международной конференции. - Москва, 2016. - С.17.

31. Профили активности цитотоксических и цитолитических механизмов нейтрофильных гранулоцитов при неопластических заболеваниях пищеварительной системы / И.В. Нестерова, С.В. Ковалёва, Е.В. Фомичева, и др. // Российский иммунологический журнал. - 2010. - Т. 4 (13), № 3. - С. 267-275.

32. Радзинский, В.Е. Миома матки: проблемы и перспективы начала века / В.Е. Радзинский, М.П. Архипова // Медицинский совет. - 2014. - № 9. - С.30–33.

33. Различные варианты дефектов функционирования нейтрофильных гранулоцитов при врожденных пневмониях у новорожденных / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Е.И. Клещенко, и др. // Российский иммунологический журнал. - №6(2). – С.170-176.

34. Стрижаков, А.Н. Миома матки: патогенез, диагностика, лечение / А.Н. Стрижаков, А.И. Давыдов, В.А. Лебедев, и др. // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2008. - № 7 (4). – С.7–19.

35. Функциональная активность нейтрофилов и процессы формирования ими сетей внеклеточной ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы молочной железы / И.И. Долгушин, А.Б. Семенова,

Ю.С.Шишкова и др. // Медицинский вестник Башкортостана. - 2014. – Т.9, № 5. - С.132-135.

36. Чудилова, Г.А. Особенности влияний *in vitro* регуляторных цитокинов на фенотип субпопуляций CD62L+CD63-, CD62L+CD63+ и микробицидную активность нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком тканей / Г.А. Чудилова, И.В. Нестерова, С.В. Ковалева, Л.В. Ломтатидзе // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. - 2020. - Т. 24, № 4. - С. 304–314.

37. A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers / A.M. Aliper, V.P. Frieden-Korovkina, A. Buzdin, et al. // Cancer Med. – 2014. – Vol.3, № 4. - P.737-746.

38. A role for IL-18 in neutrophil activation / B.P. Leung, S. Culshaw, J.A. Gracie, et al. // J Immunol. – 2001. – Vol.167, №5. – P. 2879-86.

39. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1 / J. Pillay, V.M. Kamp, E. van Hoffen, et al. // J Clin Invest. – 2012. – Vol.122, №1. – P.327-336.

40. Abdel-Salam, B.K. Expression of CD11b and CD18 on polymorphonuclear neutrophils stimulated with interleukin-2 / B.K. Abdel-Salam, H. Ebaid // Cent Eur J Immunol. – 2014. – Vol.39, №2. – P. 209-15.

41. Acuff, H.B. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment / H.B. Acuff, K.J. Carter, B. Fingleton, et al. // Cancer Research. – 2006. – Vol. 66, №1. –P. 259–266.

42. Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Impairs Neutrophil Extracellular Trap Formation and Ameliorates Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury / S. Duarte, P. Matian, S. Ma, et al. // Am J Pathol. – 2018. – Vol.188, №8. – P.1820-1832.

43. Afonina, I.S. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme / I.S. Afonina, C. Müller, S.J. Martin, R. Beyaert // Immunity. – 2015. Vol.42, №6. – P. 991-1004.

44. Aging and cancer: The role of macrophages and neutrophils / C. Jackaman, F. Tomay, L. Duong, et al. // *Ageing Res Rev.* – 2017. – Vol.36. – P.105-116.
45. Agonists to the A3 adenosine receptor induce G-CSF production via NF-kappaB activation: a new class of myeloprotective agents / S. Bar-Yehuda, L. Madi, D. Barak, et al. // *Exp Hematol.* – 2002. – Vol.30, №12. – P.1390-1398.
46. Akgul, C. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors / C. Akgul, S.W. Edwards // *Cell Mol Life Sci.* – 2003. – Vol.60, №11. – P. 2402-2408.
47. Alfaro, C. Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) / C. Alfaro, A. Teijeira, C. Oñate, et al. // *Clin Cancer Res.* 2016. – Vol. 22 (15). – P.3924-3936.
48. Altered Degranulation and pH of Neutrophil Phagosomes Impacts Antimicrobial Efficiency in Cystic Fibrosis / E. Hayes, M.P. Murphy, K. Pohl, et al. // *Front Immunol.* – 2020. – Vol.11. – P.600033.
49. An immunosuppressive subtype of neutrophils identified in patients with hepatocellular carcinoma / Y. Tsuda, H. Fukui, A. Asai, et al. // *J Clin Biochem Nutr.* – 2012. – Vol. 51, № 3. – P.204-212.
50. Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervicalcancer / S. Punt, G.J. Fleuren, E. Kritikou, et al. // *Oncoimmunology.* – 2015. – Vol. 4, № 1. – P. e984539.
51. Anti-inflammatory effect of IL-1ra-loaded dextran/PLGA microspheres on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated macrophages in vitro and in vivo in a rat model of periodontitis / B. Ren, J. Lu, M. Li, et al. // *Biomed Pharmacother.* – 2021. - Vol. 134. – P.111171.
52. Ardi, V.C. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis / V.C. Ardi, T.A. Kupriyanova,

E.I. Deryugina, J.P. Quigley // Proc Natl Acad Sci U S A. 2007. – Vol. 104(51). – P. 20262-20267.

53. Association of JMJD3, MMP-2 and VEGF expressions with clinicopathological features of invasive ductal breast carcinoma / X. Xu, J. Wang, C. Yan, et al. // Journal of Southern Medical University. - 2020. - Vol. 40, № 11. - P.1593-1600.

54. Atzpodien, J. Peripheral blood neutrophils as independent immunologic predictor of response and long-term survival upon immunotherapy in metastatic renal-cell carcinoma / J. Atzpodien, M. Reitz // Cancer Biother Radiopharm. – 2008. – Vol. 23, № 1. – P.129-134.

55. Balkwill, F. Inflammation and cancer: back to Virchow? / F. Balkwill, A. Mantovani // Lancet. - 2001. – Vol.357(9255). P.539–545.

56. Barbu, E.A. Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises / E.A. Barbu, L. Mendelsohn, L. Samsel, S.L. Thein // Cytokine. –2020. -Vol.127. - P.154933.

57. Bhatla, N. Cancer of the cervix uteri / N. Bhatla, D. Aoki, D.N. Sharma, R. Sankaranarayanan // IntJGynaecol Obstet. – 2018. – Vol. 143, suppl 2. P.22-36.

58. Bhatla, N. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri / N. Bhatla, J.S. Berek // Int J Gynaecol Obstet. – 2019. –Vol.145, №1. – P.129-135.

59. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) / P.E. Van den Steen, B. Dubois, I. Nelissen, et al. // Crit Rev Biochem Mol Biol. – 2002. – Vol.37, №6. – P.375-536.

60. Biomarker potential of IL-6 and VEGF-A in ascitic fluid of epithelial ovarian cancer patients / V. Dalal, R. Kumar, S. Kumar, et al. // Clin Chim Acta. – 2018. –Vol.482. – P.27-32.

61. Biomolecular basis related to inflammation in the pathogenesis of endometrial cancer / C. Borghi, U. Indraccolo, G. Scutiero, et al. // Eur Rev Med Pharmacol Sci. – 2018.- Vol.22(19). – P.6294-6299.

62. Bladder cancer producing granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): a case report / T. Asano, S. Morimoto, Y. Kitami, et al. // *Hinyokika Kyo.* - 2002. - Vol.48, №8. – P.495-498.
63. Blocking Fc α receptor I on granulocytes prevents tissue damage induced by IgA autoantibodies / L.P. van der Steen, J.E. Bakema, A. Sesarman, et al. // *J Immunol.* – 2012. – Vol.189, №4. – P.1594-1601.
64. Blue and Long-Wave Ultraviolet Light Induce in vitro Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation / E. Neubert, K.M.Bach, J.Busse, et al. // *Front Immunol.* – 2019. – Vol.10. – P.2428.
65. Brackett, C.M. IL-17 promotes neutrophil entry into tumor-draining lymph nodes following induction of sterile inflammation / C.M. Brackett, J.B. Muhitch, S.S. Evans, S.O. Gollnick // *J Immunol.* – 2013. – Vol. 191, № 8. – P. 4348-4357.
66. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression / M.M. Queen, R.E. Ryan, R.G. Holser, et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65 (19). – P.8896-8904.
67. Breedveld, A. IgA and Fc α RI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities / A. Breedveld, M. van Egmond // *Front Immunol.* – 2019. – Vol.10. – P. 553.
68. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? / V. Brinkmann, A. Zychlinsky // *J Cell Biol.* – 2012. – Vol.198, №5. – P.773-783.
69. Brint, E. Editorial: IL-1 Family Members in Health and Disease / E. Brint, T. Kamradt, S.L. Doyle // *Front Immunol.* - 2019. – Vol.10. – P. 2596.
70. Brown, J. Mucinous tumors of the ovary: current thoughts on diagnosis and management / J. Brown, M. Frumovitz // *Curr Oncol Rep.* - 2014. – Vol.16, №6. – P. 389.
71. Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis / F. Shojaei, X.Wu, C.Zhong, et al. // *Nature.* – 2007. – Vol. 450 (7171). – P.825-831.

72. Cadmium exposure induces apoptosis, inflammation and immunosuppression through CYPs activation and antioxidant dysfunction in common carp neutrophils / S. Jiabin, W. Shengchen, C. Yirong, et al. // *Fish Shellfish Immunol.* – 2020. – Vol. 99. – P. 284-290.

73. c-ANCA-induced neutrophil-mediated lung injury: a model of acute Wegener's granulomatosis / K. Hattar, S. Oppermann, C. Ankele, et al. // *Eur Respir J.* – 2010. – Vol. 36, № 1. – P.187-195.

74. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps / J. Park, R.W. Wysocki, Z. Amoozgar, et al. // *Sci Transl Med.* – 2016. – Vol.8(361). – P.361ra138.

75. Cancer-associated V-ATPase induces delayed apoptosis of protumorigenic neutrophils / S.A. Ibrahim, A. Kulshrestha, G.K. Katara, et al. // *Mol Oncol.* – 2020. – Vol.14, №3. – P.590-610.

76. Carcinoembryonic antigen and CD44 variant isoforms cooperate to mediate colon carcinoma cell adhesion to E- and L-selectin in shear flow / S.N. Thomas, F. Zhu, R.L. Schnaar, et al. // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283 (23). – P.15647-15655.

77. Carnevale, S. The complexity of neutrophils in health and disease: Focus on cancer. / S. Carnevale, S. Ghasemi, A. Rigatelli, S. Jaillon // *Semin Immunol.* – 2020. –P. 101409.

78. Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand / K. Miwa, M. Asano, R. Horai, et al. // *Nat Med.* – 1998. – Vol.4, №11. – P.1287-1292.

79. Cassatella, M.A. Biological roles of neutrophil-derived granule proteins and cytokines / M.A. Cassatella, N.K. Ostberg, N. Tamassia, O. Soehnlein // *Trends Immunol.* - 2019. – Vol. 40. – P. 648–664.

80. Cassatella, M.A. On the production of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2L) by human neutrophils / M.A. Cassatella // *J Leukoc Biol.* – 2006. – Vol.79, №6. – P.1140-1149.

81. Cathepsin B as a potential prognostic and therapeutic marker for human lung squamous cell carcinoma / F. Gong, X. Peng, C. Luo, et al. // *Mol Cancer*. – 2013. – Vol.12, №1. – P.125.
82. CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation / M. Bai, R. Grieshaber-Bouyer, J. Wang, et al. // *Blood*. - 2017. - pii: blood-2017-03-768507.
83. Cell Type-Specific Roles of NF-kappaB Linking Inflammation and Thrombosis / M. Mussbacher, M. Salzman, C. Brostjan, et al. // *Front Immunol*. – 2019. – Vol.10. – P.85.
84. Cervical cancer systemic inflammation score: a novel predictor of prognosis / R.R. Zheng, M. Huang, C. Jin, et al. // *Oncotarget*. - 2016. - Vol. 7, № 12. - P.42.
85. Chandrasekar, B. TNF-alpha and H2O2 induce IL-18 and IL-18R beta expression in cardiomyocytes via NF-kappa B activation / B. Chandrasekar, J.T. Colston, S.D. de la Rosa, et al. // *Biochem Biophys Res Commun*. - 2003. – Vol.303, №4. – P. 1152-1158.
86. Chatfield, S.M. Expanding Neutrophil Horizons: New Concepts in Inflammation / S.M. Chatfield, N. Thieblemont, V. Witko-Sarsat // *J Innate Immun*. – 2018. – Vol. 10, № 5-6. – P. 422-431.
87. Che, K. Role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in renal cell carcinoma / K. Che, W. Han, M. Zhang, H. Niu // *Oncol Lett*. - 2021. – Vol.21, №2. – P.148.
88. Chen, Y.L. Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils / Y.L. Chen, S.H. Chen, J.Y. Wang, B.C. Yang // *J Immunol*. – 2003. – Vol.171, №3. – P. 1183-1191.
89. Chimaeric Lym-1 monoclonal antibody-mediated cytolysis by neutrophils from G-CSF-treated patients: stimulation by GM-CSF and role of Fc gamma –receptors / L. Ottonello, A.L. Epstein, M. Mancini, et al. // *Br J Cancer*. – 2001. – Vol.85, №3. – P.463-469.

90. Circulating Cytokines and Nitric Oxide are Involved in the Inhibition of Neutrophil Migration in Patients with Uterine Cervical Neoplasia / D.C. Micheli, P.C.Jr. Fernandes, J.C. Cruvinel, et al. // *Clin Med Insights Oncol.* – 2012. – Vol.6. – P.233-242.
91. Circulating IL-6 concentrations link tumour necrosis and systemic and local inflammatory responses in patients undergoing resection for colorectal cancer / G.J.K. Guthrie, C.S.D. Roxburgh, C.H. Richards, et al. // *Br J Cancer.* – 2013. – Vol.109, №1. – P.131-137.
92. Circulating neutrophils may play a role in the host response in cervical cancer / P.C.Jr. Fernandes, C.B. Garcia, D.C. Micheli, et al. // *Int J Gynecol Cancer.* – 2007. – Vol.17, №5. – P.1068-74.
93. Clinical response, vascular change, and angiogenesis in gonadotropin-releasing hormone analogue-treated women with uterine myomas / A. Di Lieto, M. De Falco, F. Pollio, et al. // *J Soc Gynecol Investig.* – 2005. – Vol. 12, № 2. – P.123-128.
94. Coffelt, S.B. Neutrophils in cancer: neutral no more / S.B. Coffelt, M.D. Wellenstein, K.E. de Visser // *Nat Rev Cancer.* – 2016. – Vol. 16, № 7. – P. 431-446.
95. Combination of preoperative neutrophil-lymphocyte ratio, platelet-lymphocyte ratio and monocyte-lymphocyte ratio: a superior prognostic factor of endometrial cancer / R. Cong, F. Kong, J. Ma, et al. // *BMC Cancer.* - 2020. – Vol. 20, №1. – P. 464.
96. Condamine, T. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function / T. Condamine, D.I. Gabrilovich // *Trends Immunol.* – 2011. - Vol.32, №1. – P.19-25.
97. Conservative treatment in early stage endometrial cancer: a review / G. Trojano, C. Olivieri, R. Tinelli, et al. // *Acta Biomed.* – 2019. – Vol. 90, № 4. – P.405-410.

98. Cools-Lartigue, J. Neutrophil extracellular traps in cancer progression / J. Cools-Lartigue, J. Spicer, S. Najmeh, L. Ferri // *Cell Mol Life Sci.* – 2014. – Vol. 71(21). – P. 4179-4194.
99. Correlation of Immune Cells and Cytokines in the Tumor Microenvironment with Elevated Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio in Blood: An Analysis of Muscle-Invasive Bladder Cancer / Y. Morizawa, M. Miyake, K. Shimada, et al. // *Cancer Invest.* – 2018. – Vol.36, №7. – P.395-405.
100. Coughlan, A.M. Humanised mice have functional human neutrophils / A.M. Coughlan, S.J. Freeley, M.G. Robson // *J Immunol Methods.* – 2012. – Vol.385, №1-2. – P. 96-104.
101. Coussens, L.M. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? / L.M. Coussens, L. Zitvogel, A.K. Palucka // *Science.* – 2013. Vol. 339 (6117). – P.286-291.
102. Cowland, J.B. Granulopoiesis and granules of human neutrophils / J.B. Cowland, N. Borregaard // *Immunol Rev.* – 2016. -Vol.273, №1 - P.11-28.
103. Cruceriu, D. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches / D. Cruceriu, O. Baldasici, O. Balacescu, I. Berindan-Neagoe // *Cell Oncol (Dordr).* – 2020. – Vol.43, №1. – P.1-18.
104. Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the "dark side of the moon" / N. Tamassia, F. Bianchetto-Aguilera, F. Arruda-Silva, et al. // *Eur J Clin Invest.* – 2018. – Vol.48, Suppl 2. – P.e12952.
105. de Bont, C.M. Neutrophil proteases degrade autoepitopes of NET-associated proteins / C.M. de Bont, N. Eerden, W.C. Boelens, G.J.M. Pruijn // *Clin Exp Immunol.* – 2020. – Vol.199, №1. – P.1-8.
106. de Oliveira-Junior, E.B. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes / E.B. de Oliveira-Junior, J. Bustamante, P.E. Newburger, A. Condino-Neto // *Scand J Immunol.* – 2011. - Vol. 73, №5. – P. 420-427.

107. Dinarello, C.A. Reduction of inflammation by decreasing production of interleukin-1 or by specific receptor antagonism / C.A. Dinarello // *Int J Tissue React.* – 1992. – Vol.14, №2. – C.65-75.
108. Direct killing of interleukin-2-transfected tumor cells by human neutrophils / F. Pericle, R.A. Kirken, P.K. Epling-Burnette, et al. // *Int J Cancer.* – 1996. – Vol.66, №3. – P.367-373.
109. Du, H. Expression of G-CSF and clinical pathological significance in cervical cancer / H. Du, H. Zhang, Y. Zhang, Q. Wang // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2016. – Vol. 96, №5. – P.358-360.
110. Dumitru, C.A. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression / C.A. Dumitru, S. Lang, S. Brandau // *Semin Cancer Biol.* – 2013. -Vol.23, №3. – C.141-148.
111. Eash, K.J. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow / K.J. Eash, A.M. Greenbaum, P.K. Gopalan, D.C. Link // *J Clin Invest.* – 2010. – Vol.120, №7. – P. 2423-31.
112. Elghetany, M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review / M.T. Elghetany // *Blood Cells Mol Dis.* - 2002. - Vol.28, №2. – P.260-274.
113. Enhanced expression of intranuclear NF-kappa B in primed polymorphonuclear leukocytes in systemic inflammatory response syndrome patients / Y. Nakamori, T. Koh, H. Ogura, et al. // *J Trauma.* – 2003. – Vol. 54, № 2. – P.253-260.
114. Enhanced Fc α RI-mediated neutrophil migration towards tumour colonies in the presence of endothelial cells / M.A. Otten, J.E. Bakema, C.W. Tuk, et al. // *Eur J Immunol.* – 2012. – Vol.42, №7. – P.1815-1821.
115. Enhancement of polymorphonuclear cell-mediated tumor cell-mediated tumor cell killing on simultaneous engage meant of fcgammaRI(CD64) and fcalphaRI (CD89) / M. Van Egmond, A.B. van Spriel, H. Vermeulen, et al. // *Cancer Res.* - 2001. - Vol.61, №10. - P.4055-4060.

116. Esmailbeig, M. Interleukin-18: a regulator of cancer and autoimmune diseases/ M. Esmailbeig, A. Ghaderi // *Eur Cytokine Netw.* – 2017. – Vol. 28, № 4. – P.127-140.
117. Espinoza-Sánchez, N.A. IL-1 β , IL-8, and Matrix Metalloproteinases-1, -2, and -10 Are Enriched upon Monocyte-Breast Cancer Cell Cocultivation in a Matrigel-Based Three-Dimensional System / N.A. Espinoza-Sánchez, G.K. Chimal-Ramírez, A. Mantilla, E.M. Fuentes-Pananá // *Front Immunol.* – 2017. –Vol.8. – P.205.
118. Evidence and impact of neutrophil extracellular traps in malignant melanoma / F. Schedel, S. Mayer-Hain, K.I. Pappelbaum, et al. // *Pigment Cell Melanoma Res.* – 2020. – Vol.33, №1. – P.63-73.
119. Expression of CXCR4, MMP-13 and β -catenin indifferent histological subtypes of facial basal cell carcinoma / M.E. Ciurea, D. Cernea, C.C. Georgescu, et al. // *Rom J Morphol Embryol.* – 2013. – Vol.54, №4. – P.939-951.
120. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. / G.M. Thomas, C. Carbo, B.R. Curtis, et al. // *Blood.* – 2012. – Vol. 119 (26). – P.6335-6343.
121. Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells / S.P. Cullen, C.M. Henry, C.J. Kearney, et al. // *Mol Cell.* – 2013. – Vol. 49, № 6. – P.1034-1048.
122. Faul, F. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences / F. Faul, E. Erdfelder, A.-G. Lang, A. Buchner // *Behavior Research Methods.* - 2007. – Vol.39. – P. 175-191.
123. Faurschou, M. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation / M. Faurschou, N. Borregaard // *Microbes Infect.* – 2003. – Vol. 5 (14). – P.1317-1327.
124. Fc α RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy / T. Valerius, B. Stockmeyer, A.B. van Spriël, et al. // *Blood.* – 1997. – Vol.90, №11. – P.4485-4492.

125. Felix, K. Neutrophil-Derived Proteases in the Microenvironment of Pancreatic Cancer -Active Players in Tumor Progression / K. Felix, M.M. Gaida // *Int J Biol Sci.* - 2016. -Vol.12, №3. – P.302-313.
126. Fetz, A.E. Neutrophils in Biomaterial-Guided Tissue Regeneration: Matrix Reprogramming for Angiogenesis / A.E. Fetz, M.Z. Radic, G.L. Bowlin // *Tissue Eng Part B Rev.* – 2021. – Vol.27, №2. – C.95-106.
127. Fields, J.K. Structural Basis of IL-1 Family Cytokine Signaling / J.K. Fields, S. Günther, E.J.Sundberg // *Front Immunol.* – 2019. – Vol.10. – P.1412.
128. Forsberg, M. Tumour necrosis factor-alpha potentiates CR3-induced respiratory burst by activating p38 MAP kinase in human neutrophils /M. Forsberg, R. Löfgren, L. Zheng, O. Stendahl // *Immunology.* – 2001. – Vol.103, №4. – P.465-72.
129. Fotheringham, J.A. Epstein-Barr virus latent membrane protein-2A induces ITAM/Syk- and Akt-dependent epithelial migration through α v-integrin membrane translocation / J.A. Fotheringham, N.E. Coalson, N. Raab-Traub // *J Virol.* – 2012. –Vol.86(19). – P.10308-10320.
130. Fox, S. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease / S. Fox, A.E. Leitch, R. Duffin, et al. // *J Innate Immun.* – 2010. – Vol.2, №3. – P.216-227.
131. Freeman, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton / S. Freeman, S. Grinstein // *Immunol Rev.* – 2014. – Vol.262. – P.193–215.
132. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases / Z. Huang, N. Xie, P. Illes, et al. // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. – Vol.6, №1. – P. 162.
133. Frontline Science: Tumor necrosis factor- α stimulation and priming of human neutrophil granule exocytosis / K.R. McLeish, M.L. Merchant, T.M. Creed, et al. // *J Leukoc Biol.* – 2017. – Vol.102, №1. – P.19-29.
134. Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. Mechanism of activation of antifungal activity against *Candida albicans* by IL-2 /

J.Y. Djeu, J.H. Liu, S. Wei, et al. // *J Immunol.* – 1993. – Vol.150, №3. – P. 960-970.

135. Furze, R.C. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow / R.C. Furze, S.M. Rankin // *Immunology.* 2008. - 125, №3. – Vol.281. – P.8.

136. Gallová, L. IL-10 does not affect oxidative burst and expression of selected surface antigen on human blood phagocytes in vitro / L. Gallová, L. Kubala, M. Cíz, A. Lojek // *Physiol Res.* - 2004. – Vol.53, №2. – C.199-208.

137. García-García, E. Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK are required for NF-kappaB activation but not for phagocytosis / G. Sánchez-Mejorada, C. Rosales // *J Leukoc Biol.* – 2001. – Vol. 70, №4. – P. 649-658.

138. G-CSF is a key modulator of MDSC and could be a potential therapeutic target in colitis-associated colorectal cancers / W. Li, X. Zhang, Y. Chen, et al. // *Protein Cell.* – 2016. - Vol.7, №2. – P. 130-140.

139. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS / P. Scapini, B. Nardelli, G. Nadali, et al. // *J Exp Med.* – 2003. – Vol.197, №3. – P.297-302.

140. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities / P.E. Van Den Steen, A. Wuyts, S.J. Husson, et al. // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – Vol.270. – P.3739–3749.

141. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli / X. Zhang, Y. Kluger, Y. Nakayama, et al. // *J Leukoc Biol.*-2004.-№2.-P.358.

142. Gierlikowska, B. Phagocytosis, Degranulation and Extracellular Traps Release by Neutrophils-The Current Knowledge, Pharmacological Modulation and Future Prospects / B. Gierlikowska, A. Stachura, W. Gierlikowski, U. Demkow // *Front Pharmacol.* – 2021. –Vol.12. – P.666732.

143. Giese, M.A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment / M.A. Giese, L.E. Hind, A. Huttenlocher // *Blood.* – 2019. – Vol. 133 (20). – P. 2159-2167.

144. Girard, D. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis / D. Girard, R. Paquin, A.D. Beaulieu // *Biochem J.* – 1997. – Vol. 325 (Pt 1). – P.147-153.
145. Gonzalez-Aparicio, M. Influence of Interleukin-8 and Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation in the Tumor Microenvironment: Is There a Pathogenic Role? / M. Gonzalez-Aparicio, C. Alfaro // *J Immunol Res.* – 2019. – Vol.2019. – P.6252138.
146. Gonzalez-Avila, G. Matrix Metalloproteinases' Role in Tumor Microenvironment / G. Gonzalez-Avila, B. Sommer, A.A. García-Hernández, C. Ramos // *Adv Exp Med Biol.* – 2020. – Vol.1245. – P.97-131.
147. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) regulates neutrophils infiltration and periodontal tissue destruction in an experimental periodontitis / Z. Zhang, W. Yuan, J. Deng, et al. // *Mol Immunol.* - 2020. - №117. - P.110-121.
148. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils / Y. Ohki, B. Heissig, Y. Sato, et al. // *FASEB J.* – 2005. – Vol.19(14). – P.2005-2007.
149. Granulocyte-macrophagecolony-stimulatingfactor (GM-CSF): a chemoattractiveagent for murineleukocytes in vivo / M. Khajah, B. Millen, D.C. Cara, et al. // *J Leukoc Biol.* – 2011. - Vol.89, №6. – P.945-953.
150. Grecian, R. The role of neutrophils in cancer / R. Grecian, M.K.B. Whyte, S.R. Walmsley // *Br Med Bull.* – 2018. – Vol.128, №1. – P.5-14.
151. Gregory, A.D. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy / A.D. Gregory, A.M. Houghton // *Cancer Res.* – 2011. – Vol.71, №7. – P.2411-2416.
152. Grenier, A. Presence of a mobilizable intracellular pool of hepatocyte growth factor in human polymorphonuclear neutrophils / A. Grenier, S. Chollet-Martin, B. Crestani, et al. // *Blood.* – 2002. – Vol.99, №8. – P.2997-3004.

153. Groemping, Y. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase / Y. Groemping, K. Lapouge, S.J. Smerdon, K. Rittinger // *Cell*. – 2003. – Vol.113, №3. – P.343-355.
154. Gu, C. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling / C. Gu, L. Wu, X. Li // *Cytokine*. - 2013. - Vol.64, №2. – P.477-485.
155. Gu, F.M. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma / F.M. Gu, Q.L. Li, Q. Gao, et al. // *J. Mol Cancer*. – 2011. – Vol.10. – P. 150.
156. Guleria, S. Risk of epithelial ovarian cancer among women with benign ovarian tumors: a follow-up study / S. Guleria, A. Jensen, A. Toender, S.K. Kjaer // *Cancer Causes Control*. – 2020. - Vol.31, №1. – P.25-31.
157. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – Vol.144, №5. – P.646-674.
158. Hauptmann, S. Ovarian borderline tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria / S. Hauptmann, K. Friedrich, R. Redline, S. Avril // *Virchows Arch*. - 2017. - Vol.470, №2. – P.125-142.
159. Hemann, E.A. IFN- λ 'guts' neutrophil-mediated inflammation / E.A. Hemann, J. Schwerk, R. Savan // *Nat Immunol*. - 2017. - Vol. 18, № 10. – P.1061-1062.
160. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB / M.A. Arruda, A.G. Rossi, M.S. de Freitas, et al. // *J Immunol*. 2004. – Vol.173, №3. - P.2023-2030.
161. High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparan sulfate proteoglycans and its release from the cell surface by matrix metalloproteinases: Possible role as a proinflammatory mediator in arthritis / F. De Ceuninck, F. Allain, A. Caliez, et al. // *Arthritis Rheum*. – 2003. – Vol.48. – P.2197–2206.
162. High oxidative stress adversely affects NF κ B mediated induction of inducible nitric oxide synthase in human neutrophils: Implications in chronic

myeloid leukemia / A.K. Singh, D. Awasthi, M. Dubey, et al. // Nitric Oxide. – 2016. – Vol.58. – P.28-41.

163. Hodgkin Lymphoma-Derived Extracellular Vesicles Change the Secretome of Fibroblasts Toward a CAF Phenotype / B. Dörsam, T. Bösl, K.S. Reiners, et al. // Front Immunol. – 2018. – Vol.9. – P.1358.

164. Hoesel, B. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer / B. Hoesel, J.A. Schmid // Mol Cancer. – 2013. - Vol.12. – P.86.

165. Huang, H. Neutrophil Elastase and Neutrophil Extracellular Traps in the Tumor Microenvironment / H. Huang, H. Zhang, A.E. Onuma, A. Tsung // Adv Exp Med Biol. – 2020. – Vol.1263. - P.13-23.

166. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes / D. Sbardella, G.F. Fasciglione, M. Gioia, et al. // Mol Aspects Med. – 2012. – Vol.33, №2. – P.119-208.

167. Human Neutrophils Produce CCL23 in Response to Various TLR-Agonists and TNF α / F. Arruda-Silva, F. Bianchetto-Aguilera, S. Gasperini, et al. // Front Cell Infect Microbiol. – 2017. -№7. – P.176.

168. Hurtado-Nedelec, M. Assessment of priming of the human neutrophil respiratory burst / K. Makni-Maalej, M.A. Gougerot-Pocidallo, P.M. Dang, J. El-Benna // Methods Mol Biol. – 2014. – Vol.1124. – P. 405-412.

169. Hwang, S.J. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma / S.J. Hwang, K.R. Shroyer // J Oncol. – 2012. – Vol.2012. – P.507286.

170. Hyperglycemia Induces Neutrophil Extracellular Traps Formation Through an NADPH Oxidase-Dependent Pathway in Diabetic Retinopathy / L. Wang, X. Zhou, Y. Yin, et al. // Front Immunol. - 2019. - №9. - P.3076.

171. Hypoxia-induced Elevation in Interleukin-8 Expression by Human Ovarian Carcinoma Cells / L. Xu, K. Xie, N. Mukaida, et al. // Cancer Res. - 1999. - Vol.59. -P.5822.

172. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans / S. Massena,

G. Christoffersson, E. Vågesjö, et al. // *Blood*. – 2015. – Vol. 126 (17). – P.2016-2026.

173. IL-17 induces antitumor immunity by promoting beneficial neutrophil recruitment and activation in esophageal squamous cell carcinoma / C.L. Chen, Y. Wang, C.Y. Huang, et al. // *Oncoimmunology*. - 2017. – Vol. 7, № 1. – P. e1373234.

174. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis / S.B. Coffelt, K. Kersten, C.W. Doornebal, et al. // *Nature*. – 2015. – Vol.522(7556). – P. 345-348.

175. IL-1RA suppresses esophageal cancer cell growth by blocking IL-1alpha / S. Chen, Z. Shen, Z. Liu, et al. // *J Clin Lab Anal*. – 2019. – Vol. 33, № 6. – P.e22903.

176. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils / E. Brandt, G. Woerly, A.B. Younes, et al. // *J Leukoc Biol*. – 2000. – Vol.68, №1. – P. 125-30.

177. IL-6 and IL-8 as Prognostic Factors in Peritoneal Fluid of OvarianCancer / I.S.S. Rodrigues, A. Martins-Filho, D.C. Micheli, et al. // *Immunol Invest*. - 2020. – Vol.49, №5. – P.510-521.

178. Immature neutrophils mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors 1 / M.A. Otten, E. Rudolph, M. Dechant, et al. // *J Immunol*. – 2005. – Vol.174, №9. – P.5472-5480.

179. Immunotherapy in endometrial cancer: new scenarios on the horizon / C. DiTucci, C. Capone, G. Galati, et al. // *J Gynecol Oncol*. – 2019. –Vol.30, №3. – P.:e46.

180. Infiltrating neutrophils increase bladder cancer cell invasion via modulation of androgen receptor (AR)/MMP13 signals / C. Lin, W. Lin, S. Yeh, et al. // *Oncotarget*. - 2015. - Vol.6(40). - P.43081-9.

181. Inflammation and cancer / N. Singh, D. Baby, J.P. Rajguru, et al. // *Ann Afr Med*. – 2019. – Vol.18, №3. – P.121-126.

182. Inhibition of NF-kappaB activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells / A. Shibata, T. Nagaya, T. Imai, et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2002. - Vol.73, №3. – P.237-243.
183. Integrins and cytokines activate nuclear transcription factor-kappaB in human neutrophils / R. Kettritz, M. Choi, S. Rolle, et al. // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol.279, №4. – P.2657-2665.
184. Interleukin (IL)-4 induces production of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs) and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in lungs of asthmatic rats / Y.L. Guo, H. Huang, D.X. Zeng, et al. // *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* - 2013. – Vol.33, №4. – P. 470-478.
185. Interleukin-10 controls human peripheral PMN activation triggered by lipopolysaccharide / D. Martire-Greco, N. Rodriguez-Rodrigues, V.I. Landoni, et al. // *Cytokine.* – 2013. – Vol.62, №3. – P.426-432.
186. Interleukin-10 down-regulates oxidative metabolism and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human neutrophils / F. Capsoni, F. Minonzio, A.M. Ongari, et al. // *Scand J Immunol.* – 1997. – Vol. 45, №3. – P. 269-275.
187. Interleukin-17 is associated with expression of programmed cell death 1 ligand 1 in ovarian carcinoma / A. Aotsuka, Y. Matsumoto, T. Arimoto, et al. // *Cancer Sci.* – 2019. - Vol.110, №10. – P. 3068-3078.
188. Interleukin-18 Is a Prognostic Marker and Plays a Tumor Suppressive Role in Colon Cancer / X. Feng, Z. Zhang, P. Sun, et al. // *Dis Markers.* – 2020. – Vol.2020. – P.6439614.
189. Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma / H.E. Tzeng, C.H. Tsai, Z.L. Chang, et al. // *Biochem Pharmacol.* – 2013. – Vol.85, №4. – P.531-540.
190. Interleukins 4 and 13 and Their Receptors Are Differently Expressed in Gastrointestinal Tract Cancers, Depending on the Anatomical Site and Disease Advancement, and Improve Colon Cancer Cell Viability and Motility / I.Bednarz-

Misa, D. Diakowska, I. Szczuka, et al. // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Vol.12, №6. – P. 1463.

191. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils / M. Gaudry, O. Bregerie, V. Andrieu, J. El Benna, et al. // *Blood*. – 1997. – Vol.90. – P.4153–4161.

192. Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy / T. Valerius, R. Repp, T.P. de Wit, et al. // *Blood*. – 1993. – Vol.82, №3. – P.931-939.

193. Ireland, A.S. Neutrophils Create an ImpeNETrable Shield between Tumor and Cytotoxic Immune Cells / A.S. Ireland, T.G. Oliver // *Immunity*. – 2020. – Vol.52, №5. – P.729-731.

194. Jia, D. Inflammation is a key contributor to ovarian cancer cell seeding / D. Jia, Y. Nagaoka, M. Katsumata, S. Orsulic // *Sci Rep*. – 2018. – Vol.8, №1. – P.12394.

195. Kabutomori, O. CD16 antigen density on neutrophils in chronic myeloproliferative disorders / O. Kabutomori, Y. Iwatani, T. Koh, T. Yanagihara // *Am J Clin Pathol*. – 1997. – Vol.107, №6. – P.661-664.

196. Kato, T. Regulation of neutrophil functions by proinflammatory cytokines / T. Kato, S. Kitagawa // *Int J Hematol*. – 2006. – Vol.84, №3. – P.205-209.

197. Kawakami, K. Effect of interleukin (IL)-4 cytotoxin on breast tumor growth after in vivo gene transfer of IL-4 receptor alpha chain / K. Kawakami, M. Kawakami, S.R. Husain, R.K. Puri // *Clin Cancer Res*. – 2003. – Vol.9, №5. – P.1826-36.

198. *Kdm6a* Deficiency Activates Inflammatory Pathways, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with *p53* Dysfunction / K. Kobatake, K.I. Ikeda, Y. Nakata, et al. // *Clin Cancer Res*. – 2020. – Vol.26, №8. – P.2065-2079.

199. Kindzelskii, A.L. Early membrane rupture events during neutrophil-mediated antibody-dependent tumor cell cytolysis / A.L. Kindzelskii, H.R. Petty // *J Immunol.* – 1999. – Vol.162, №6. – P.3188-3192.
200. King, J. Association of Cytokines and Chemokines in Pathogenesis of Breast Cancer / J. King, H. Mir, S. Singh // *Prog Mol Biol Transl Sci.* – 2017. – Vol.151. – P.113-136.
201. Knall, C. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases / C. Knall, G.S. Worthen, G.L. Johnson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – Vol. 94, № 7. – P. 3052-3057.
202. Knight, J.S. Editorial: Neutrophil Communication / J.S. Knight, R. Jain, M.A. Cassatella, C. Lood // *Front Immunol.* - 2020. - Vol.11. – P.871.
203. Korkmaz, B. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases / B. Korkmaz, M.S. Horwitz, D.E. Jenne, F. Gauthier // *Pharmacol Rev.* – 2010. – Vol.62, №4. – P.726-759.
204. Kubes, P. The enigmatic neutrophil: what we do not know / P. Kubes // *Cell Tissue Res.* – 2018. – Vol.371, №3. – P.399-406.
205. Kumari, N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance / N. Kumari, B.S. Dwarakanath, A. Das, A.N. Bhatt // *Tumour Biol.* – 2016. – Vol.37, №9. – P.11553-11572.
206. Kurman, R. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm / R.J. Kurman, Ie-M. Shih // *HumPathol.* – 2011. – Vol.42, №7. – P.918-931.
207. Kurman, R. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory / R.J. Kurman, Ie-M. Shih // *Am J Surg Pathol.* - 2010. Vol.34, №3. – P.433-443.
208. Laichalk, L.L. Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity / L.L. Laichalk, J.M. Danforth, T.J. Standiford // *FEMS Immunol Med Microbiol.* – 1996. – Vol.15, №4. – P.181-187.

209. Le Gallo, M. CD95/Fas, Non-Apoptotic Signaling Pathways, and Kinases / M. Le Gallo, A. Poissonnier, P. Blanco, P. Legembre // *Front Immunol.* – 2017. – Vol.8. – P.1216.
210. Lechner, M.G. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells / M.G. Lechner, D.J. Liebertz, A.L. Epstein // *J Immunol.* – 2010. – Vol.185, №4. – P.2273-2284.
211. Ledford, L.R.C. Scope and Epidemiology of Gynecologic Cancers: An Overview / L.R.C. Ledford, S.Lockwood // *Semin Oncol Nurs.* – 2019. - Vol.35, №2. – P.147-150.
212. Li, B. Neutrophil extracellular traps enhance procoagulant activity in patients with oral squamous cell carcinoma / B. Li, Y. Liu, T. Hu, et al. // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2019. - Vol.145, №7. – P.1695-1707.
213. Limaiem, F. Ovarian Cystadenoma / F. Limaiem, M.R.Lekkala, M.Mlika - 2021 In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. 211*
214. Liou, G.Y. Reactive oxygen species in cancer / G.Y. Liou, P.Storz // *Free Radic Res.* - 2010. – Vol.44, №5. – P.479-496.
215. Lippitz, B.E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review / B.E. Lippitz // *Lancet Oncol.* – 2013. – Vol.14, №6. – P.e218-28.
216. Localization of human neutrophil interleukin-8 (CXCL-8) to organelle(s) distinct from the classical granules and secretory vesicles / S. Pellmé, M. Mörgelin, H. Tapper, et al. // *J Leukoc Biol.* – 2006. – Vol.79, № 3. – P.564-573.
217. LPS responsiveness and neutrophil chemotaxis in vivo require PMN MMP-8 activity / A.M. Tester, J.H. Cox, A.R. Connor, et al. // *PLoS ONE.* – 2007. – Vol.2. – P.1072.
218. Lundahl, J. IL-8 from local subcutaneous wounds regulates CD11b activation / J. Lundahl, S.H. Jacobson, J.M. Paulsson // *Scand. J Immunol.* – 2012. - Vol.75, №4. – P. 419-425.

219. Luteolin Attenuates IL-1 β -Induced THP-1 Adhesion to ARPE-19 Cells via Suppression of NF-kB and MAPK Pathways / W.C. Huang, C.J. Liou, S.C. Shen, et al. // *Mediators Inflamm.* – 2020. – Vol.2020. – P.9421340.
220. Ma, X. Definition of Prostaglandin E2-EP2 Signals in the Colon Tumor Microenvironment That Amplify Inflammation and Tumor Growth / X. Ma, T. Aoki, T. Tsuruyama, S. Narumiya // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75 (14). – P.2822-2832.
221. Mantovani, A. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity / A. Mantovani, M.A. Cassatella, C. Costantini, S. Jaillon // *Nat Rev Immunol.* – 2011. – Vol.11, №8. – P. 519-531.
222. Mariani, F. Role of the Vanins-Myeloperoxidase Axis in Colorectal Carcinogenesis / F. Mariani, L. Roncucci // *Int J Mol Sci.* – 2017. - Vol. 18, № 5. - P. E918.
223. Marie, C. IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils / C. Marie, C. Pitton, C. Fitting, J.M. Cavaillon // *Cytokine.* - 1996. - Vol.8, №2. – P.147-151.
224. Masucci, M.T. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy / M.T. Masucci, M. Minopoli, M.V. Carriero // *Front Oncol.* - 2019. – Vol.9. – P.1146.
225. Mature CD10(+) and immature CD10(-) neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells / O. Marini, S. Costa, D. Bevilacqua, et al. // *Blood.* – 2017. - Vol. 129, №10. – P. 1343-1356.
226. McDonald, P.P. Detection of Intact Transcription Factors in Human Neutrophils / P.P. McDonald, R.D. Ye // *Methods Mol Biol.* – 2020. – Vol.2087. – P.261-275.
227. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis / L.A. O' Reilly, L. Tai, L. Lee, et al. // *Nature.* – 2009. – Vol. 461 (7264). – P.659-663.

228. Metzler, K.D. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis / K.D. Metzler, C. Goosmann, A. Lubojemska, et al. // *Cell Rep.* – 2014. - Vol.8, №3. – P.883-896.
229. MFG-E8 accelerates wound healing in diabetes by regulating "NLRP3 inflammasome-neutrophil extracellular traps" axis / W. Huang, J. Jiao, J. Liu, et al. // *Cell Death Discov.* – 2020. – Vol.6. – P. 84.
230. Microporous scaffolds loaded with immunomodulatory lentivirus to study the contribution of immune cell populations to tumor cell recruitment in vivo / G.G. Bushnell, S.S. Rao, R.M. Hartfield, et al. // *Biotechnol Bioeng.* – 2020. – Vol.117, №1. – P. 210-222.
231. Miralda, I. Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming / I. Miralda, S.M. Uriarte, K.R. McLeish // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – Vol.7. – P.217.
232. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro / N. Vorobjeva, A. Prihodko, I. Galkin, et al. // *Eur J Cell Biol.* - 2017. - Vol.96, №3. - P.254-265.
233. Mócsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond / A. Mócsai // *The Journal of Experimental Medicine.* – 2013. – Vol.210, №7. – P.1283–1299.
234. Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophil: Implications for functional down regulation and recognition by phagocytes / S.P. Hart, J.A. Ross, K. Ross, et al. // *Cell Death Differ.* – 2000. – Vol.7, №5. – P. 493-503.
235. Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer / T.T. Yen, T.L. Wang, A.N. Fader, et al. // *Int J Gynecol Pathol.* - 2020. - Vol.39, №1. - P.26-35.
236. Monkkonen, T. Inflammatory signaling cascades and autophagy in cancer / T. Monkkonen, J. Debnath // *Autophagy.* – 2018. – Vol.14, №2. – P.190-198.

237. Monocyte Induction of E-Selectin-Mediated Endothelial Activation Releases VE-Cadherin Junctions to Promote Tumor Cell Extravasation in the Metastasis Cascade / I. Häuselmann, M. Roblek, D. Protsyuk, et al. // *Cancer Res.* – 2016. – Vol.76(18). – P.5302-5312.

238. Monocytes and neutrophils as 'bad guys' for the outcome of interleukin-2 with and without histamine in metastatic renal cell carcinoma – results from a randomised phase II trial / F. Donskov, M. Hokland, N. Marcussen, et al. // *Br J Cancer.* – 2006. - Vol.94, №2. – P. 218–226.

239. Moody, C.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation / C.A. Moody, L.A. Laimins // *Nat Rev Cancer.* – 2010. – Vol.10, №8. – P.550-560.

240. Morgan, M.J. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling / M.J. Morgan, Z.G. Liu // *Cell Res.* – 2011. – Vol.21, №1. – P.103-115.

241. Mouchemore, K.A. Neutrophils, G-CSF and their contribution to breast cancer metastasis / K.A. Mouchemore, R.L. Anderson, J.A. Hamilton // *FEBS J.* – 2018. – Vol.285, №4. – P.665-679.

242. Mucinous borderline ovarian tumors with BRAF(V600E) mutation may have low risk for progression to invasive carcinomas / K. Ohnishi, K. Nakayama, M. Ishikawa, et al. // *Arch Gynecol Obstet.* – 2020. – Vol. 302, № 2. – P.487-495.

243. Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by zymosan-induced mouse neutrophils / D. Endo, T. Saito, Y. Umeki, et al. // *Inflamm Res.* - 2016. –Vol.65, №2. – C.151-159.

244. Nano, R. Ultrastructural changes of neutrophils following IL-2 treatment in vivo / R. Nano, E. Capelli, S. Barni, G. Gerzeli // *Ann N Y Acad Sci.* – 1997. – Vol.832. – P.194-199.

245. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities / C. Nathan // *Nat Rev Immunol.* – 2006. – Vol.6, №3. – P.173-182.

246. Natural killer cells induce neutrophil extracellular trap formation in venous thrombosis / F.R. Bertin, R.N. Rys, C. Mathieu, et al. // *J Thromb Haemost.* – 2019. – Vol.17, №2. – P.403-414.

247. NETosis occurs independently of neutrophil serine proteases / P. Kasperkiewicz, A. Hempel, T. Janiszewski, et al. // *J Biol Chem.* – 2020. – Vol.295(51). – P.17624-17631.

248. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture / H.R. Thiam, S.L. Wong, R. Qiu, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2020. – Vol.117(13). – P.7326-7337.

249. NET-producing CD16(high) CD62L(dim) neutrophils migrate to tumor sites and predict improved survival in patients with HNSCC / C.R. Millrud, Å. Kågedal, S. Kumlien Georén, et al. // *Int J Cancer.* – 2017. – Vol.140, №11. – P.2557-2567.

250. Neutrophil derived CSF1 induces macrophage polarization and promotes transplantation tolerance / M.S. Braza, P. Conde, M. Garcia, et al. // *Am J Transplant.* – 2018. – Vol.18, №5. – P. 1247-1255.

251. Neutrophil elastase represses IL-8/CXCL8 synthesis in human airway smooth muscle cells through induction of NF-kappa B repressing factor / S.C. Ho, K.Y. Lee, Y.F. Chan, et al. // *J Immunol.* – 2009. – Vol.183, №1. - P.411-420.

252. Neutrophil Elastase Subverts the Immune Response by Cleaving Toll-Like Receptors and Cytokines in Pneumococcal Pneumonia / H. Domon, K. Nagai, T. Maekawa, et al. // *Front Immunol.* – 2018. – Vol.9. – P.732.

253. Neutrophil extracellular traps activate IL-8 and IL-1 expression in human bronchial epithelia / K.M. Hudock, M.S. Collins, M. Imbrogno, et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2020. – Vol.319, №1. – P.137-147.

254. Neutrophil Extracellular Traps Drive Mitochondrial Homeostasis in Tumors to Augment Growth / H.O. Yazdani, E. Roy, A.J. Comerci, et al. // *Cancer Res.* - 2019. - Vol.79(21). - P.5626-5639.

255. Neutrophil extracellular traps promote gastric cancer metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition / T. Zhu, X. Zou, C. Yang, et al. // *Int J Mol Med.* - 2021. - Vol.48, №1. - P.127.

256. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via β 1-integrin mediated interactions / S. Najmeh, J. Cools-Lartigue, R.F. Rayes, et al. // *Int J Cancer.* – 2017. – Vol.140, №10. – P.2321-2330.

257. Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization / S. Starckx, P.E. Van den Steen, A. Wuyts, et al. // *Leuk Lymphoma.* – 2002. - Vol.43, №2. – P.233-241.

258. Neutrophil granulocytes promote the migratory activity of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells via ICAM-1 / C. Strell, K. Lang, B. Niggemann, et al. // *Exp Cell Res.* – 2010. – Vol.316, №1. – P.138-148.

259. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity / M. Beyrau, J.V. Bodkin, S. Nourshargh // *Open Biol.* – 2012. – Vol.2, №11. – P.120134.

260. Neutrophil kinetics in health and disease / C. Summers, S.M. Rankin, A.M. Condliffe, et al. // *Trends Immunol.* – 2010. - Vol.31№8. – P.318-324.

261. Neutrophil/lymphocyte ratio has a prognostic value for patients with terminal cancer / Y. Nakamura, R. Watanabe, M. Katagiri, et al. // *World J Surg Oncol.* - 2016. – Vol.14. – P.148.

262. Neutrophils driving unconventional T cells mediate resistance against murine sarcomas and selected human tumors / A. Ponzetta, R. Carriero, S. Carnevale, et al. // *Cell.* - 2019. – Vol.178. – P.346–360.

263. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum / W. Lee, S.Y. Ko, M.S. Mohamed, et al. // *J Exp Med.* – 2019. – Vol. 216, №1. – P. 176-194.

264. Neutrophils in anti-cancer immunological strategies: old players in new games / E. di Carlo, M. Iezzi, T. Pannellini, et al. // *J Hematother Stem Cell Res.* – 2001. –Vol.10, №6. – P. 739-748.

265. Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17--a new mechanism of impaired antitumor immunity / I. Mishalian, R. Bayuh, E. Eruslanov, et al. // *Int J Cancer*. – 2014. - Vol.135, №5. – P.1178-1186.
266. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model / J. Jablonska, S. Leschner, K. Westphal, et al. // *J Clin Invest*. –2010. – Vol.120, №4. – P.1151-1164.
267. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens / N. Branzk, A. Lubojemska, S.E. Hardison, et al. // *Nat Immunol*. – 2014.Vol.15, №11. – P. 1017-1025.
268. Neutrophils Suppress Intraluminal NK Cell-Mediated Tumor Cell Clearance and Enhance Extravasation of Disseminated Carcinoma Cells / A. Spiegel, M.W. Brooks, S. Houshyar, et al. // *Cancer Discov*. – 2016. – Vol. 60, № 6. – P.630-449.
269. Neutrophils with protumor potential could efficiently suppress tumor growth after cytokine priming and in presence of normal NK cells / R. Sun, J. Luo, D. Li, et al. // *Oncotarget*. – 2014. - Vol.5(24). – P.12621-12634.
270. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. ESMO Guidelines Working Group / N. Colombo, M. Peiretti, G. Parma, et al. // *Ann Oncol*. – 2010. – Vol.21, Suppl 5. – P. 23-30.
271. Nomelini Stromal IL2 is related to the neutrophil/lymphocyteratio in epithelial ovarian cancer / T.D. Santos, M.P. Jammal, T.P. Silveira, et al. // *Pathologica*. – 2019. – Vol.111, №2. – P.62-66.
272. Novel type III interferons produce anti-tumor effects through multiple functions / Q. Li, K. Kawamura, Y. Tada, et al. // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2013. - Vol.18. – P.909-918.
273. NSP4 is stored in azurophil granules and released by activated neutrophils as active endoprotease with restricted specificity / N.C. Perera, K.H. Wiesmüller, M.T. Larsen, et al. // *J Immunol*. 2013. – 191, №5. – P.2700-2707.

274. Oberg, H.H. Regulatory Interactions Between Neutrophils, Tumor Cells and T Cells / H.H. Oberg, D. Wesch, S. Kalyan, D. Kabelitz // *Front Immunol.* – 2019. – Vol.10. – P.1690.

275. Ohms, M. An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro / M. Ohms, S. Möller, T. Laskay // *Front Immunol.* – 2020. – Vol.11. – P.532.

276. Oncostatin M drives intestinal inflammation and predicts response to tumor necrosis factor-neutralizing therapy in patients with inflammatory bowel disease / N.R. West, A.N. Hegazy, B.M.J. Owens, et al. // *Nat Med.* - 2017. - Vol.23, №5. - P.579-589.

277. Optimal cut-off for neutrophil-to-lymphocyte ratio: Fact or Fantasy? A prospective cohort study in metastatic cancer patients / Y.A. Vano, S. Oudard, M.A. By, et al. // *PLoS One.* - 2018. - Vol.13, №4. - P.195042.

278. Origin and role of a subset of tumor-associated neutrophils with antigen-presenting cell features in early-stage human lung cancer / S. Singhal, P.S. Bhojnarwala, S. O'Brien, et al. // *Cancer Cell.* – 2016. – Vol.30. – P.120–135.

279. Ovarian cancer stem cells and macrophages reciprocally interact through the WNT pathway to promote pro-tumoral and malignant phenotypes in 3D engineered microenvironments / S. Raghavan, P. Mehta, Y. Xie, et al. // *J Immunother Cancer.* – 2019. – Vol.7, №1. – P.190.

280. Oxidative and inflammatory mediators are upregulated in neutrophils of autistic children: Role of IL-17A receptor signaling / A. Nadeem, S.F. Ahmad, S.M. Attia, et al. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* – 2019. – Vol.90. – P.204-211.

281. Palmer, L.J. Influence of complement on neutrophil extracellular trap release induced by bacteria / L.J. Palmer, C. Damgaard, P. Holmstrup, C.H. Nielsen // *J Periodontal Res.* – 2016. – Vol.51, №1. – P.70-76.

282. PASylation of IL-1receptorantagonist (IL-1Ra) retains IL-1 blockade and extends its duration in mouse urate crystal-induced peritonitis / N.E. Powers, B.

Swartzwelter, C. Marchetti, et al. // *J Biol Chem.* – 2020. – Vol. 295, № 3. – P.868-882.

283. Pathobiology of myomatosis uteri: the underlying knowledge to support our clinical practice / L.A. Torres-de la Roche, S. Becker, C. Cezar, et al. // *Arch Gynecol Obstet.* – 2017. – Vol. 296, № 4. – P.701-707.

284. Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma / D.M. Kuang, Q. Zhao, Y. Wu, et al. // *J Hepatol.* – 2011. – Vol.54. – P.948-55.

285. Pestka, S. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors / S. Pestka, C.D. Krause, M.R. Walter // *Immunol Rev.* – 2004. – Vol.202. – P.8-32.

286. Physiological levels of interleukin-18 stimulate multiple neutrophil functions through p38 MAP kinase activation / T.H. Wyman, C.A. Dinarello, A. Banerjee, et al. // *J Leukoc Biol.* - 2002. - Vol.72, №2. - P.401.

287. PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression / M.M. Kaneda, K.S. Messer, N. Ralainirina, et al. // *Nature.* – 2016. – Vol. 539 (7629). – P.437-442.

288. Pires, R.H. The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy/ R.H. Pires, S.B. Felix, M. Delcea // *Nanoscale.* – 2016. – Vol.8(29). – P.14193-14202.

289. Pleiotropic Effects of IL-2 on Cancer: Its Role in Cervical Cancer / A. Valle-Mendiola, A. Gutiérrez-Hoya, C. Lagunas-Cruz Mdel, et al. // *Mediators Inflamm.* – 2016. – Vol.2016. – P.2849523.

290. Pleskova, S.N. Treatment by serum up-conversion nanoparticles in the fluoride matrix changes the mechanism of cell death and the elasticity of the membrane / S.N. Pleskova, E.N. Gorshkova, V.V. Novikov, M. Solioz // *Micron.* – 2016. – Vol.90. – P.23-32.

291. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN / Z.G. Fridlender, J. Sun, S. Kim, et al. // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol. 16, №3. – P.183-194.

292. Pre-operative sera interleukin-6 in the diagnosis of high-grade serous ovarian cancer / N.C. Kampan, M.T. Madondo, J. Reynolds, et al. // *Sci Rep.* – 2020. – Vol.10, №1. – P.2213.
293. Pretreatment Neutrophil-to-Lymphocyte ratio (NLR) and Platelet-to-Lymphocyte Ratio (PLR) as a Predictive Value of Hematological Markers in Cervical Cancer / I.P.Y. Prabawa, A. Bhargah, F. Liwang, et al. // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2019. – Vol.20, №3. – P.863–868.
294. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites / I. Matte, D. Lane, C. Laplante, et al. // *Am J Cancer Res.* – 2012. – Vol. 2, № 5. – P.566-580.
295. Prognostic value of systemic hemato-immunological indices in uterine cervical cancer: A systemic review, meta-analysis, and meta-regression of observational studies / X. Han, S. Liu, G. Yang, et al. // *Gynecol Oncol.* – 2021. – Vol. 160, № 1. – P.351-360.
296. Progress in mechanism of formation of neutrophil extracellular traps / K. Zhang, W. He, X. Guo, et al. // *Review. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* - 2020. - Vol.36, №6. - P.561-564.
297. Putative Serine Protease is Required to Initiate the RIPK3-MLKL-Mediated Necroptotic Death Pathway in Neutrophils / X. Wang, D. Avsec, A. Obreza, et al. // *Front Pharmacol.* - 2021. - №11. - P.614928.
298. Rainard, P. Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor-alpha and the des-arginine derivative of C5a / P. Rainard, C. Riollot, B. Poutrel, M.J. Paape // *Am J Vet Res.* – 2000. – Vol.61, №8. – P.951-959.
299. Rajarathnam, K. How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways / K. Rajarathnam, M. Schnoor, R.M. Richardson, S. Rajagopal // *Cell Signal.* – 2019. – Vol.54. – P.69-80.

300. Rawat, K. Neutrophil-derived granule cargoes: paving the way for tumor growth and progression / K. Rawat, S. Syeda, A. Shrivastava // *Cancer Metastasis Rev.* - 2021. - Vol.40, №1. – P.221-244.

301. Regulatory effects of interleukin-4 and interleukin-10 on human neutrophil function ex vivo and on neutrophil influx in a rat model of arthritis / L.A. Bober, A. Rojas-Triana, J.V. Jackson, et al. // *Arthritis Rheum.* – 2000. – Vol.43, №12. – P.2660-2667.

302. Risk factors for benign, borderline and invasive mucinous ovarian tumors: epidemiological evidence of a neoplastic continuum? / S.J. Jordan, A.C. Green, D.C. Whiteman, et al. // *Gynecol Oncol.* – 2007. – Vol.107, №2. – P.223-230.

303. Rosales, C.J. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity / C.J. Rosales // *Leukoc Biol.* – 2020. – Vol.108, №1. – P.377-396.

304. Sagiv, J.Y. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer / J.Y. Sagiv, J. Michaeli, S. Assi // *Cell Rep.* - 2015. – Vol.10. – P.562–573.

305. Serum levels of rapid turnover proteins are decreased and related to systemic inflammation in patients with ovarian cancer/ T. Watanabe, M. Shibata, H. Nishiyama, et al. // *Oncol Lett.* - 2014. - Vol.7, №2. - P.373-377.

306. Serum tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) are associated with prognosis in esophageal cancer patients / M. Kozłowski, W. Laudański, B. Mroczko, et al. // *Adv Med Sci.* – 2013, Vol.58, №2. – P.227-234.

307. Shaul, M.E. Cancer-related circulating and tumor-associated neutrophils - subtypes, sources and function / M.E. Shaul, Z.G. Fridlender // *FEBS J.* – 2018. – Vol. 285 (23). – P.4316-4342.

308. Shirasuna, K. Emerging roles of immune cells in luteal angiogenesis / K. Shirasuna, T. Shimizu, M. Matsui, A. Miyamoto // *Reprod Fertil Dev.* – 2013. – Vol.25, №2. – P.351-361.

309. Shrihari, T.G. Dual role of inflammatory mediators in cancer / T.G. Shrihari // *Ecancer medical science.* – 2017. – Vol.11. – P.721.

310. Skendros, P. Autophagy in Neutrophils: From Granulopoiesis to Neutrophil Extracellular Traps / P. Skendros, I.Mitroulis, K.Ritis // *Front Cell Dev Biol.* – 2018. – Vol.6. – P.109.
311. Smuda, C. TLR-induced activation of neutrophils promotes histamine production via a PI3 kinase dependent mechanism / C. Smuda, J.B.Wechsler, P.J. Bryce // *Immunol Lett.* – 2011. – Vol. 141, №1. – P.102-108.
312. Song, J. In vivo processing of CXCL5 (LIX) by matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 promotes early neutrophil recruitment in IL-1 β -induced peritonitis / J. Song, C. Wu, X. Zhang, L.M. Sorokin // *J. Immunol.* – 2013. – Vol.190. – P.401–410.
313. Squamous cell carcinoma of the cervix producing granulocyte colony-stimulating factor / K. Nasu, C. Inoue, N. Takai, et al. // *Obstet Gynecol.* – 2004. - Vol.104 (5Pt1). – P. 1086-1088.
314. Stanley, A.C. Pathways for cytokine secretion / A.C. Stanley, P. Lacy // *Physiology (Bethesda).* – 2010. – Vol.25, №4. – P.218-229.
315. Swierczak, A. FACS isolation and analysis of human circulating and tumor neutrophils / A. Swierczak, J.W. Pollard // *Methods Enzymol.* – 2020. – Vol.632. – P.229-257.
316. Swierczak, A. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis / A. Swierczak, K.A. Mouchemore, J.A. Hamilton, R.L. Anderson // *Cancer Metastasis Rev.* – 2015. – Vol.34. – P.735–751.
317. Syk mediates IL-17-induced CCL20 expression by targeting Act1-dependent K63-linked ubiquitination of TRAF6 / N.L. Wu, D.Y. Huang, H.N. Tsou, et al. // *J Invest Dermatol.* - 2015. - Vol. 135, №. - P.490-498.
318. Synergistic innate and adaptive immune response to combination immunotherapy with anti-tumor antigen antibodies and extended serum half-life IL-2 / E.F. Zhu, S.A. Gai, C.F. Opel, et al. // *Cancer Cell.* - 2015. - Vol. 13, № 4. - P.489-501.
319. Tas, M. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in discriminating precancerous pathologies from cervical cancer / M. Tas, A.Yavuz, M. Ak, B. Ozcelik // *J Oncol.* – 2019. –Vol. 2019. – P.2476082.

320. Tay, S.H. Low-Density Neutrophils in Systemic Lupus Erythematosus / S.H. Tay, T. Celhar, A.M. Fairhurst // *Arthritis Rheumatol.* – 2020. – Vol. 72, №10. – P.1587-1595.
321. Tecchio, C. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors / C. Tecchio, P. Scapini, G. Pizzolo, M.A. Cassatella // *Semin Cancer Biol.* – 2013. – Vol.23, №3. – P.159-170.
322. Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice / C. Maria de Souza, L. Fonseca de Carvalho, T. da Silva Vieira, et al. // *Biomed Pharmacother.* – 2012. – Vol. 66, № 7. – P.491-498.
323. The naturally processed CD95L elicits a c-cyes/calcium/PI3K-driven cell migration pathway / S. Tauzin, B. Chaigne-Delalande, E. Selva, et al. // *PLoS Biol.* – 2011. – Vol. 9, № 6. – P.e1001090.
324. The Neutrophil: Constant Defender and First Responder / N. Fine, N. Tasevski, Ch. A. McCulloch, et al. // *Front Immunol.* – 2020. – Vol.11. – P. 571085.
325. The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) predicts short-term and long-term outcomes in gastric cancer patients / R. Miyamoto, S. Inagawa, N. Sano, et al. // *Eur J Surg Oncol.* – 2018. – Vol.44, №5. – P.607-612.
326. The NF-kappaB pathway mediates lysophosphatidic acid (LPA)-induced VEGF signaling and cell invasion in epithelial ovarian cancer (EOC) / S. Dutta, F.Q. Wang, H.S. Wu, et al. // *Gynecol Oncol.* - 2011 Vol. 123, № 1. – P.129-137.
327. The Ovarian Cancer Tumor Immune Microenvironment (TIME) as Target for Therapy: A Focus on Innate Immunity Cells as Therapeutic Effectors / D. Baci, A. Bosi, M. Gallazzi, et al. // *Int J Mol Sci.* - 2020. - Vol. 21, № 9. – P. 3125.
328. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils / T. Boussetta, M.A. Gougerot-Pocidallo, G.Hayem, et al. // *Blood.* – 2010. – Vol. 116 (26). – P. 5795-802.
329. The relationships between systemic cytokine profiles and inflammatory markers in colorectal cancer and the prognostic significance of these parameters /

J.W. Park, H.J. Chang, H.Y. Yeo, et al. // *Br J Cancer*. – 2020. – Vol.123, №4. – P.610-618.

330. The tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promotes survival and migration of acute myeloid leukemia cells through CD63/PI3K/Akt/p21 signaling / D. Forte, V. Salvestrini, G. Corradi, et al. // *Oncotarget*. - 2017. – Vol.8, №2. – P.2261-2274.

331. Theron, A.J. Contrasting Immunopathogenic and Therapeutic Roles of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Cancer / A.J. Theron, H.C. Steel, B.L. Rapoport, R. Anderson // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2020. – Vol. 13, № 11. – P.406.

332. Thomas, C.J. Pattern recognition receptor function in neutrophils / C.J. Thomas, K. Schroder // *Trends Immunol*. – 2013. – Vol.34, №7. – P.317-328.

333. TIMP-1 signaling via CD63 triggers granulopoiesis and neutrophilia in mice / J. Kobuch, H. Cui, B. Grünwald, et al. // *Haematologica*. – 2015. – Vol.100, №8. – P.1005-1013.

334. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Promotes Polymorphonuclear Neutrophil (PMN) Pericellular Proteolysis by Anchoring Matrix Metalloproteinase-8 and -9 to PMN Surfaces / X. Wang, J. Rojas-Quintero, J. Wilder, et al. // *J Immunol*. - 2019. - №11. - P.3267-3281.

335. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice / B. Seubert, B. Grünwald, J. Kobuch, et al. // *Hepatology*. – 2015. – Vol.61, №1. – P.238-248.

336. TNF induces neutrophil adhesion via formin-dependent cytoskeletal reorganization and activation of beta-integrin function / A.A.A. Silveira, V.M. Dominical, C.B. Almeida, et al. // *J Leukoc Biol*. – 2018. – Vol.103, №1. – P.87-98.

337. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation / X. Zhao, L. Rong, X. Zhao, et al. // *J Clin Invest*. - 2012. - Vol.122, №11. - P.104. 369

338. TNF α signalling predicts poor prognosis of patients with endometrial cancer / V. Wieser, S. Abdel Azim, S. Sprung, et al. // *Carcinogenesis*. - 2020. - Vol.41, №8. - P.1065-1073.
339. TNF α -activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2 neutrophils / P.F. Yu, Y. Huang, Y.Y. Han, et al. // *Oncogene*. - 2017. - Vol.36, №4. - P.482-490.
340. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: Acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells / C. Iking-Konert, C. Csekö, C. Wagner, et al. // *J Mol Med (Berl)*. – 2001. – Vol.79, №8. – P.464-474.
341. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer / M.R. Galdiero, E. Bonavita, I. Barajon, et al. // *Immunobiology*. – 2013. – Vol. 218, № 11. – P.1402-1410.
342. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1 / F. Dallegrì, L. Ottonello, A. Ballestrero, et al. // *Inflammation*. - 1991. – Vol.15, №1. – P.15-30.
343. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors / G.T. Motz, S.P. Santoro, L.P. Wang, et al. // *Nat Med*. – 2014. – Vol.20, №6. – P.607-615.
344. Tumor necrosis factor in lung cancer: Complex roles in biology and resistance to treatment / K. Gong, G. Guo, N. Beckley, et al. // *Neoplasia*. – 2021. – Vol.23, №2. – P. 189-196.
345. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer / E.B. Eruslanov, P.S. Bhojnarwala, J.G. Quatromoni, et al. // *Clin Invest*. – 2014. – Vol.124, №12. – P.5466-5480.
346. Tumor-associated vacuolar ATPase sub unit promotes tumorigenic characteristics in macrophages / G.K. Katara, M.K. Jaiswal, A. Kulshrestha, et al. // *Oncogene*. – 2014. – Vol. 33(49). – P.5649-54.
347. Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells / S. Li, X. Cong, H. Gao, et al. // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2019. – Vol.38, №1. – P.6.

348. Tumor-Contacted Neutrophils Promote Metastasis by a CD90-TIMP-1 Juxtacrine-Paracrine Loop / Y. Wang, J. Chen, L. Yang, et al. // *Clin Cancer Res.* - 2019. - Vol.25, №6. - P.1957-1969.

349. Tumor-derived exosomes induce N2 polarization of neutrophils to promote gastric cancer cell migration / X. Zhang, H. Shi, X. Yuan, et al. // *Mol Cancer.* - 2018. - Vol.6, №1. - P.146.

350. Tumor-derived granzyme B-expressing neutrophils acquire antitumor potential after lipid A treatment / A. Martin, C. Seignez, C. Racœur, et al. // *Oncotarget.* – 2018. – Vol.9(47). – P.28364-28378.

351. Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation / E.M. Bekes, B. Schweighofer, T.A. Kupriyanova, et al. // *Am J Pathol.* – 2011. – Vol.179, №3. – P.1455-1470.

352. Type 2 Interleukin-4 Receptor Signaling in Neutrophils Antagonizes Their Expansion and Migration during Infection and Inflammation / J. Woytschak, N. Keller, C. Krieg, et al. // *Immunity.* – 2016. - Vol.45, №1. – P.172-184.

353. Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human / L. Andzinski, N. Kasnitz, S. Stahnke, et al. // *Int J Cancer.* - 2016. – Vol.138, №8. – P.1982-93.

354. Ultrasound Features Improve Diagnostic Performance of Ovarian Cancer Predictors in Distinguishing Benign and Malignant Ovarian Tumors / Y.N. Chen, F. Ma, Y.D. Zhang, et al. // *Curr Med Sci.* – 2020. – Vol.40, №1. – P. 184-191.

355. Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases / X. Wang, L. Qiu, Z. Li, et al. // *Front Immunol.* - № 9. - P.2456.

356. Uribe-Querol, E. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process / E. Uribe-Querol, C. Rosales // *Front Immunol.* – 2020. – 11. – C.1066.

357. Ustyanovska Avtenyuk, N. The Neutrophil: The Underdog That Packs a Punch in the Fight against Cancer / N. Ustyanovska Avtenyuk, N. Visser, E. Bremer, V.R. Wiersma // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21 (21). – P.7820.

358. Varol, C. Phagocyte-extracellular matrix crosstalk empowers tumor development and dissemination / C. Varol, I. Sagi // *FEBS J.* - 2018. - Vol. 285, № 4. - P.734-751.
359. VEGF and IL-18 in induced sputum of lung cancer patients / N. Rovina, G. Hillas, E. Dima, et al. // *Cytokine.* – 2011. - Vol. 54, № 3. – P.277-281.
360. VEGF and metalloproteinase 2 (MMP 2) expression in gastric cancer tissue / R. Partyka, M. Gonciarz, P. Jałowicki, et al. // *Med Sci Monit.* – 2012. Vol.18, №4. – P.BR130-4.
361. Vermot, A. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology / A. Vermot, I. Petit-Härtlein, S.M.E. Smith, F. Fieschi // *Antioxidants.* - 2021. - Vol.10, №6. - P.890.
362. von Köckritz-Blickwede, M. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps / M. von Köckritz-Blickwede, V. Nizet // *J Mol Med.* - 2009. - Vol.87, №8. - P.775.
363. Voronov, E. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis / E. Voronov, Y. Carmi, R.N. Apte // *Front Physiol.* - 2014. - Vol.5. - P.114.
364. Wang, D. NF-kappa B p50 regulates C/EBP alpha expression and inflammatory cytokine-induced neutrophil production / D. Wang, I. Paz-Priel, A.D. Friedman // *J Immunol.* - 2009. - Vol.182, №9. - P.5757.
365. Wang, X. Paraquat-induced reactive oxygen species inhibit neutrophil apoptosis via a p38 MAPK/NF-kB-IL-6/TNF- α positive-feedback circuit / X. Wang, F. Luo, H. Zhao // *PLoS One.* – 2014. – Vol.9, №4. – P.:e93837.
366. Weng, Y.S. MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6R signaling axis promotes EMT progression, cancer stemness and M2 macrophage polarization in triple-negative breast cancer / Y.S. Weng, H.Y. Tseng, Y.A. Chen, et al. // *Mol Cancer.* - 2019. - Vol. 18, № 1. - P.42.
367. Winterbourn, C.C. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome / C.C. Winterbourn, A.J. Kettle // *Antioxid Redox Signal.* - 2013. - Vol. 18, №6. - P.642.
368. Wright, H.L. RNA-seq reveals activation of both common and cytokine-specific pathways following neutrophil priming / H.L. Wright,

H.B. Thomas, R.J. Moots, S.W. Edwards // PLoS One. - 2013. - Vol.8, №3. - P.58598.

369. Yang, C.W. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants / C.W. Yang, B.S. Strong, M.J. Miller, E.R. Unanue // J Immunol. - 2010. - Vol.1, №5. - P.2927.

370. Yoshimura, T. IFN-gamma-mediated survival enables human neutrophils to produce MCP-1/CCL2 in response to activation by TLR ligands / T. Yoshimura, M. Takahashi // J Immunol. - 2007. - №3. - P.1942.

371. Young, R.H. Ovarian tumors: a survey of selected advances of note during the life of this journal / R.H. Young // Hum Pathol. - 2020. – Vol. 95. - P.169-206.

372. Zhang, W. IL-1 Signaling in Tumor Microenvironment / W. Zhang, N. Borchering, R. Kolb // Adv Exp Med Biol. - 2020. - №1. - P.1240.

373. Zhou, Q. Prognostic significance of neutrophil to lymphocyte ratio in ovarian cancer: evidence from 4910 patients / Q. Zhou, L. Hong, M.Z. Zuo, Z. He // Oncotarget. - 2017. - Vol. 3, № 40. - P.68938–68949.

374. Zlatarova, Z.I. Expression of matrix metalloproteinase-1, -9, -13, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in basal cell carcinomas of the eyelid / Z.I. Zlatarova, E.B. Softova, K.G. Dokova, E.M. Messmer // Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. - 2012. - №3. - P.425.

375. Zmijewski, J.W. Participation of mitochondrial respiratory complex III in neutrophil activation and lung injury / J.W. Zmijewski, E. Lorne, S. Banerjee, E. Abraham // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. - 2009. - № 4. - P.34.