

Оригинальное исследование

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ641688>

EDN: CFVRKH



Характеристики функционального состояния нейтрофилов периферической крови у пациентов с люминальным раком молочной железы

Ю.Д.Д. Коробкина¹, Е.-И.А. Адаманская^{1,2}, Н.И. Польшина³, С.В. Галкина^{1,2}, Т.И. Кадыров¹, Н.П. Горбунов⁴, А.В. Соколов⁴, Л.Г. Жукова³, А.Н. Свешникова^{1,2}

¹ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия;

² Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия;

³ Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова, Москва, Россия;

⁴ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Нейтрофилы играют критически важную роль в развитии опухоли, а их функциональное состояние может служить прогностическим маркером. Однако функциональные характеристики нейтрофилов периферической крови, такие как хемотаксис и склонность к нетозу, у пациенток с люминальным раком молочной железы изучены недостаточно. Исследование этих параметров может дать новые сведения о механизмах прогрессии заболевания и реакции на терапию.

Цель — проведение анализа хемотаксической активности нейтрофилов и склонность к нетозу в образцах крови пациенток с местно-распространенным люминальным раком молочной железы, проходящих лечение (неоадъювантную химиотерапию) в Московском клиническом научном центре им. А.С. Логинова.

Методы. Исследование проводили на образцах крови шести пациенток с III стадией люминального В, HER2-негативного рака молочной железы до начала и через два месяца противоопухолевой терапии. В качестве контроля использовали образцы крови здоровых взрослых добровольцев. Работа выполнена с использованием методов флуоресцентной микроскопии для хемотаксиса нейтрофилов при росте тромбов и количества внеклеточных ДНК-ловушек нейтрофилов по реакции с Hoechst 33342 и антителами против миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы в мазках богатой лейкоцитами плазмы крови.

Результаты. До начала неоадъювантной терапии уровень нетоза значительно повышен ($30 \pm 14\%$ против $4,6 \pm 3,4\%$ у здоровых доноров), при этом у большинства пациенток на терапии происходит снижение его уровня ($17 \pm 17\%$). Скорость движения нейтрофилов повышена у некоторых пациенток ($0,17 \pm 0,06$ против $0,113 \pm 0,009$ мкм/с у здоровых доноров) и снижаются на терапии ($0,10 \pm 0,03$ мкм/с). При этом количество ассоциированных с тромбами нейтрофилов снижается на терапии (25 ± 18 против 61 ± 23) даже у пациенток с нейтроцитозом.

Заключение. Впервые показано, что у пациенток с люминальным В, HER2-негативным раком молочной железы скорость хемотаксиса нейтрофилов отклоняется от нормы; при этом их адгезия понижена, а нейтрофилы периферической крови значительно более склонны к нетозу, чем у здоровых доноров.

Ключевые слова: рак молочной железы; нейтрофилы; хемотаксис; тромбовоспаление; ДНК-ловушки нейтрофилов.

Как цитировать

Коробкина Ю.Д.Д., Адаманская Е.-И.А., Польшина Н.И., Галкина С.В., Кадыров Т.И., Горбунов Н.П., Соколов А.В., Жукова Л.Г., Свешникова А.Н. Характеристики функционального состояния нейтрофилов периферической крови у пациентов с люминальным раком молочной железы // Медицинский академический журнал. 2025. Т. 25. № 2. С. 76–84. DOI: 10.17816/MAJ641688 EDN: CFVRKH

Original Study Article

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ641688>

EDN: CFVRKH

Characteristics of the Functional State of Peripheral Blood Neutrophils in Patients With Luminal Breast Cancer

Julia Jessica D. Korobkina¹, Ekaterina-Iva A. Adamanskaya^{1,2}, Natalya I. Polshina³, Sofia V. Galkina^{1,2}, Timur I. Kadyrov¹, Nikolay P. Gorbunov⁴, Alexey V. Sokolov⁴, Lyudmila G. Zhukova³, Anastasia N. Sveshnikova^{1,2}

¹ Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology RAS, Moscow, Russia;

² Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russia;

³ Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow, Russia;

⁴ Institute for Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Neutrophils are essential in tumor growth, and their functional state can serve as a prognostic biomarker. However, the functional characteristics of peripheral blood neutrophils, such as chemotaxis and predisposition to NETosis, in female patients with luminal breast cancer have not been sufficiently explored. Studying these parameters may provide new insights into the mechanisms of disease progression and response to therapy.

AIM: This work aimed to analyze the chemotactic activity of neutrophils and predisposition to NETosis in blood samples of female patients with locally advanced luminal breast cancer undergoing treatment (neoadjuvant chemotherapy) at the Loginov Moscow Clinical Scientific Center.

METHODS: The study was conducted on blood samples from six patients with stage 3 luminal B, HER2-negative breast cancer before and 2 months after the start of antitumor therapy. Blood samples from healthy adult volunteers were used as controls. The work was performed using fluorescence microscopy methods for neutrophil chemotaxis with the growth of blood clots and the number of extracellular DNA traps of neutrophils by reaction with Hoechst 33342 and antibodies against myeloperoxidase and neutrophil elastase in smears of blood plasma rich in leukocytes.

RESULTS: Before the start of neoadjuvant therapy, the level of NETosis is significantly increased ($30\% \pm 14\%$ versus $4.6\% \pm 3.4\%$ in healthy donors), whereas most female patients undergoing therapy experience its reduction ($17\% \pm 17\%$). The speed of neutrophil movement is increased in some female patients (0.17 ± 0.06 versus 0.113 ± 0.009 $\mu\text{m/s}$ in healthy donors) and goes down during therapy (0.10 ± 0.03 $\mu\text{m/s}$). At the same time, the number of neutrophils associated with blood clots decreases during therapy (25 ± 18 versus 61 ± 23) even in patients with neutrophilia.

CONCLUSION: It has been demonstrated for the first time that in female patients with luminal B, HER2-negative breast cancer, the neutrophil chemotaxis speed deviates from the standard; at the same time, their adhesion is reduced, and peripheral blood neutrophils are significantly more predisposed to NETosis than in healthy donors.

Keywords: breast cancer; neutrophils; chemotaxis; thromboinflammation; neutrophil DNA traps.

To cite this article

Korobkina JJD, Adamanskaya E-IA, Polshina NI, Galkina SV, Kadyrov TI, Gorbunov NP, Sokolov AV, Zhukova LG, Sveshnikova AN. Characteristics of the Functional State of Peripheral Blood Neutrophils in Patients With Luminal Breast Cancer. *Medical Academic Journal*. 2025;25(2):76–84. DOI: [10.17816/MAJ641688](https://doi.org/10.17816/MAJ641688)
EDN: CFVRKH

Submitted: 07.11.2024

Accepted: 15.11.2024

Published online: 24.06.2025

ОБОСНОВАНИЕ

Процессы воспаления считаются важной составляющей развития опухоли [1], так как клетки врожденного иммунитета оказывают влияние на рост, инвазию и распространение опухолевых клеток [2]. Участие нейтрофилов в развитии опухолевого процесса может быть довольно сложным и многосторонним [3, 4]. Так, при колоректальном раке повышенное количество нейтрофилов, ассоциированных с опухолью (tumor-associated neutrophils, TAN), положительно влияет на прогноз [5]. В мышиных моделях различных типов солидных опухолей подавление рекрутирования нейтрофилов в опухоль ускоряет ее рост и усиливает метастазирование [6–8]. С другой стороны, для целого ряда онкологических заболеваний высокое соотношение нейтрофилов к лимфоцитам периферической крови — неблагоприятный прогностический фактор [9]. Во многих работах TAN связывают с неблагоприятным прогнозом при раке легких, поджелудочной железы или почек [10–12]. Нейтрофилы могут способствовать росту опухоли, повышая скорость ангиогенеза [13] и способствуя миграции и инвазии ее клеток [14]. С другой стороны, нейтрофилы могут создавать благоприятное для действия иммунотерапии микроокружение опухоли [15].

Отрицательную роль в прогрессии онкологических заболеваний и развитии резистентности к терапии играют ДНК-содержащие внеклеточные ловушки нейтрофилов (neutrophil extracellular trap, NET) [16]. Эти ловушки — вариант борьбы с патогенами, они «выбрасываются» гиперактивированными нейтрофилами в виде нитей ДНК в ассоциации с активными бактерицидными ферментами, в том числе миелопероксидазой (MPO) и нейтрофильной эластазой (NE) [17]. NET также могут быть причиной рак-ассоциированных тромбозов [18], они вызывают повышение устойчивости опухоли к терапии [19], при этом основным действием считается стимуляция NET эпителиально-мезенхимального перехода [20], стимуляция неоангиогенеза [21, 22] и создание неблагоприятного опухолевого микроокружения [23, 24].

В последние годы развилось представление, что TAN делятся на две группы: антиопухолевые (TAN1) и проопухолевые (TAN2) [6, 25]. Эти две группы отличаются в первую очередь функциональными особенностями [26], поэтому оценка различных активностей нейтрофилов при онкологических заболеваниях может позволить получить информацию о прогрессии опухоли.

Рак молочной железы (РМЖ) — наиболее частое онкологическое заболевание у обоих полов [27]. Среди женщин 24,5% всех новых случаев онкологических заболеваний приходится на РМЖ. Будучи гетерогенным заболеванием, РМЖ представлен разными подтипами, из которых превалирует люминальный (гормон-зависимый, экспрессирующий рецепторы эстрогенов и/или прогестерона, HR-положительный) HER2-негативный подтип (70% всех подтипов РМЖ) [28].

TAN ассоциированы с большинством опухолей при РМЖ, при этом HR-негативные опухоли чаще содержат TAN [29]. При РМЖ повышение количества TAN свидетельствует о неблагоприятном прогнозе, однако изучение TAN проводили в хирургически извлеченных опухолях [30]. В связи с этим наблюдение функциональных характеристик нейтрофилов в образцах периферической крови при РМЖ представляет особый интерес.

Цель — применение разработанных нами ранее методов оценки состояния нейтрофилов (метода *ex vivo* наблюдения хемотаксиса нейтрофилов в проточных камерах в условиях тромбовоспаления [31, 32] и метода оценки доли нейтрофилов, испытывающих нетоз при контакте с чужеродной поверхностью [33]) для образцов крови пациенток с местно-распространенным люминальным HER2-негативным РМЖ до и через 2 мес. после комбинированной терапии противоопухолевыми препаратами.

МЕТОДЫ

В исследовании использовались следующие реагенты: Annexin V-Alexa Fluor 647 (BioLegend, San Diego, CA), окраска DiOC(6), бычий сывороточный альбумин (BSA), Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI), fibrillar collagen type I (Chrono-Log Corporation; Havertown; США). Для получения антител против MPO и NE выделяли гомогенные препараты ферментов из экстракта лейкоцитов [34, 35], которыми иммунизировали соответственно мышей и кроликов. Лимфоциты иммунизированных мышей использовали для получения гибридом по технологии Мильштейна–Келлера с селекцией клона, продуцирующей специфические моноклональные антитела против MPO. Из сыворотки иммунизированных NE кроликов выделили фракцию иммуноглобулинов G.

Исследование было одобрено ЛЭК ГБУЗ МKNЦ им. А.С. Логинова ДЗМ (протокол № 3/2023 от 28.02.2023). Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией, от всех доноров и пациентов было получено информированное согласие на проведение исследования и публикацию результатов без предоставления личных сведений. В исследовании приняли участие 6 пациенток с ранним люминальным РМЖ (табл. 1) и 8 здоровых взрослых доноров (2 мужчины, 6 женщин, 21–40 лет). Терапию проводили согласно рутинной практике учреждения. Кровь собирали в вакуумные пробирки Sarstedt-Monovette с гирудином (525 ATU/мл) или с EDTA (1,6 мг/мл). Эксперименты проводили в течение 3 ч после сбора крови.

Долю нейтрофилов, испытывавших нетоз при контакте со стеклом, определяли по протоколу, опубликованному ранее [32, 33]. Исследовали мазки богатой лейкоцитами плазмы ЭДТА-антикоагулированной крови, полученной в результате свободного осаждения эритроцитов в течение 45 мин при комнатной температуре. Высыхание мазка происходило за время не более 20 с. Далее проводили фиксацию (2% параформальдегид) и окраску первичными

Таблица 1. Характеристики пациентов, включенных в исследование

Table 1. Characteristics of patients covered by the study

Код пациента	Возраст (II—I*, мес.)	Тромбоциты (норма 180–320×10 ³ /мкл), I/II*	Нейтрофилы (норма 2–7,5×10 ⁹ /л), I/II*	Заболевание	Комментарии
МАО	45(2)	180/146	2,04/4,49	Рак правой молочной железы cT2N3M0G3, IIIC стадия. Люминальный В, HER2-негативный	ГБ 2-й степени
МЮИ	33(2)	215/258	2,57/15,29	BRCA1-ассоциированный рак левой молочной железы cT2N3fM0G3, IIIC стадия. Люминальный тип В, HER2-негативный	Курение
ЗСА	46(3)	231/280	3,73/1,65	Рак правой молочной железы cT4bN1fM0G3, IIIB стадия. Люминальный тип В, HER2-негативный	
МЕГ	62(2)	262/236	5,78/23,52	Рак правой молочной железы cT2N3M0G2, IIIC стадия. Люминальный В, HER2-негативный	ГБ 3-й степени
КЕА	37(2)	274/271	4,79/10,91	Рак левой молочной железы cT2N0M0G3, IIA стадия. Люминальный подтип В (с низкой экспрессией эстрогенов ER+3), HER2-негативный	
МСЕ	55(2)	242/217	8,37/4,31	Рак левой молочной железы cT4bN3fM0G2, IIIC стадия. Люминальный тип В, HER2-негативный	

Примечание. *I — точка до начала терапии; II — точка после начала терапии: доксорубин 60 мг/м² + циклофамид 600 мг/м², 1 раз в 2 нед. (4 курса в дозоуплотненном режиме при использовании первичной профилактики G-CSF); ГБ — гипертоническая болезнь.

антителами к МРО и НЕ. Наблюдение проводили с помощью конфокального микроскопа Nikon Ti2 AX. Гранулоциты определяли как клетки, положительные по МРО и НЕ и обладающие характерной морфологией ядра (3 или 4 сегмента). Нетозный гранулоцит определяли по детекции ДНК за границами клетки. Для достоверного определения нетоза обрабатывали не менее 100 клеток.

Наблюдение хемотаксиса нейтрофилов проводили в рамках *ex vivo* модели тромбовоспаления, описанной ранее [31, 32]. Адгезию нейтрофилов из цельной крови, антикоагулированной гирудином, наблюдали в плоско-параллельных проточных камерах с иммобилизованным фибриллярным коллагеном 1-го типа, кровь прокачивали со скоростью сдвига 100 с⁻¹. Нейтрофилы идентифицировали как совершающие прерывистое движение клетки с 3–4 сегментами ядра (окраска Hoechst 33342), обладающие выраженным потенциалом плазматической мембраны [окраска DiOC(6)]. В работах [31, 32] было показано, что именно эти клетки положительны по маркерам нейтрофилов CD66b, CD66ас, CD11 и CD18. Лейкоциты, не совершающие активных движений, не учитывали. Рост тромбов и движение лейкоцитов наблюдали с помощью флуоресцентной микроскопии [Nikon Eclipse Ti-E (40x/0,50 Plan Fluor)].

РЕЗУЛЬТАТЫ

У пациентов с РМЖ наблюдается повышенный уровень нетоза. Спонтанный нетоз нейтрофилов наблюдался как в крови здоровых людей, так и у пациентов с РМЖ (рис. 1, а). При этом у пациентов с РМЖ до начала терапии доля нейтрофилов, переходящих в нетоз в мазках плазмы крови, была значимо выше, чем у здоровых (рис. 1, а). В когорте здоровых доноров наблюдался почти абсолютный

суицидальный нетоз (99%) (рис. 1, б). У некоторых пациентов с РМЖ повышен уровень витального нетоза. Тип нетоза определяли визуальной оценкой фотографий образцов с учетом морфологических изменений клетки (см. приложение 1, DOI: 10.17816/MAJ641688-4222132). В случае разрыва клеточной мембраны и вытеснения во внеклеточное пространство ДНК-нитей вкупе с антимикробными пептидами клетка нами была охарактеризована как нейтрофил, ушедший в суицидальный нетоз. При целостности клеточной мембраны и везикулы ДНК по периферии клетки нетоз считали витальным. В первой точке значимое количество витального нетоза наблюдалось у 3 пациенток — МАО, МЕГ и МСЕ (см. рис. 1, б), две из них страдают гипертонической болезнью (см. табл. 1). На фоне терапии у 5 пациенток повышается доля витального нетоза (рис. 1, с); у МСЕ до терапии более 90% NET были витальными, после терапии более 90% NET суицидальными.

У всех пациенток кроме одной (ЗСА) на фоне терапии наблюдается заметное снижение уровня нетоза (см. рис. 1, а). Именно у ЗСА на фоне терапии развилась нейтропения (см. табл. 1), поэтому уровень нетоза может отражать реакцию нейтрофилов на снижение их количества. У 3 пациенток на фоне терапии развился нейтроцитоз (возможно, за счет применения G-CSF), однако это не повлияло на уровень нетоза.

У пациентов с РМЖ наблюдается сниженное рекрутирование нейтрофилов к растущим тромбам после начала терапии.

В экспериментальной модели тромбовоспаления регистрировали количество адгезировавших активно движущихся нейтрофилов и скорость их движения (рис. 2, приложение 2, DOI: 10.17816/MAJ641688-4222133). Скорости движения нейтрофилов имели большой разброс как в большую, так и в меньшую сторону (см. рис. 2, а,

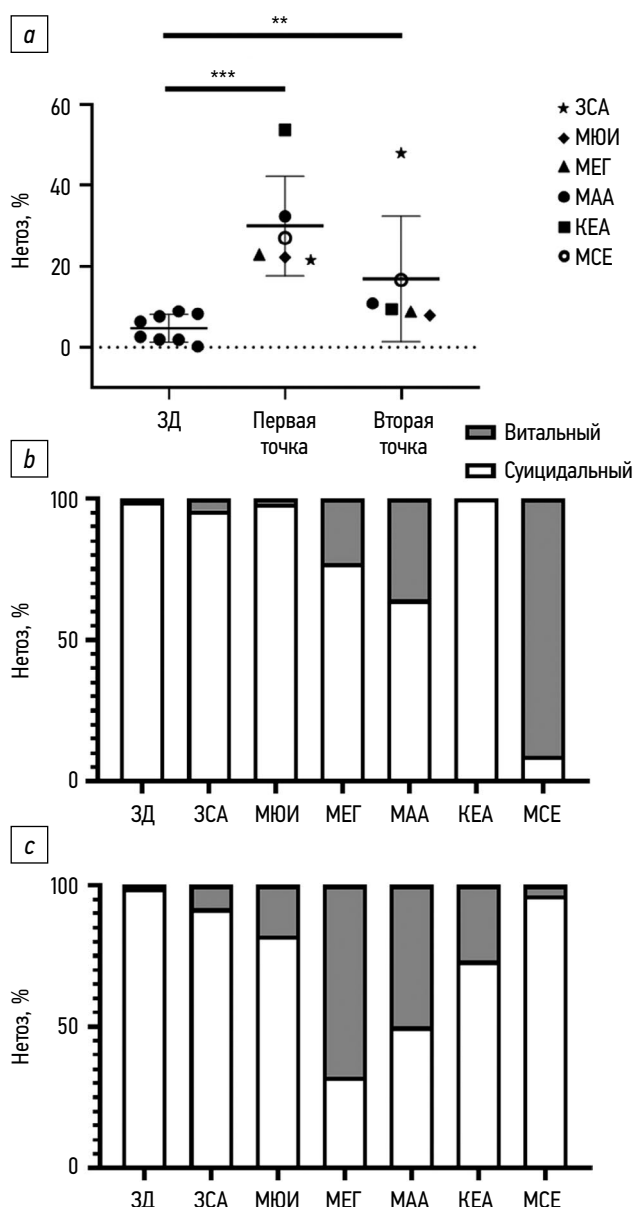


Рис. 1. Наблюдение нетоза в мазках плазмы крови. *a* — Доля нетотных нейтрофилов. Для сравнения со здоровыми донорами использовали критерий Манна–Уитни: $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. Между первой и второй точкой статистически значимой разницы нет (согласно парному критерию Вилкоксона при сравнении без ЗСА, $p = 0,06$). Соотношение типов нетоза в первой (*b*) и второй (*c*) точках исследования. ЗД — группа здоровых доноров ($n = 8$). ЗСА, МЮИ, МEG, МАА, КЕА, МСЕ — коды пациентов.

Fig. 1. Observation of NETosis in blood plasma smears. *a*, means a proportion of NETotic neutrophils. The Mann–Whitney criterion was used for comparison with healthy donors: $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. There is no statistically significant difference between the first and second points (according to the Wilcoxon signed-rank test when comparing without ЗСА, $p = 0.06$). The ratio of NETosis at the first (*b*) and second (*c*) study points. ЗД means a group of healthy donors ($n = 8$). ЗСА, МЮИ, МEG, МАА, КЕА, МСЕ are patient codes.

приложение 3, DOI: 10.17816/MAJ641688-4222134). При этом до начала терапии наблюдается статистически значимое увеличение скорости нейтрофилов (за счет значений пациентки ЗСА), которая после начала терапии снижается. С другой стороны, количество рекрутируемых к тромбу нейтрофилов после начала терапии ниже, чем у здоровых

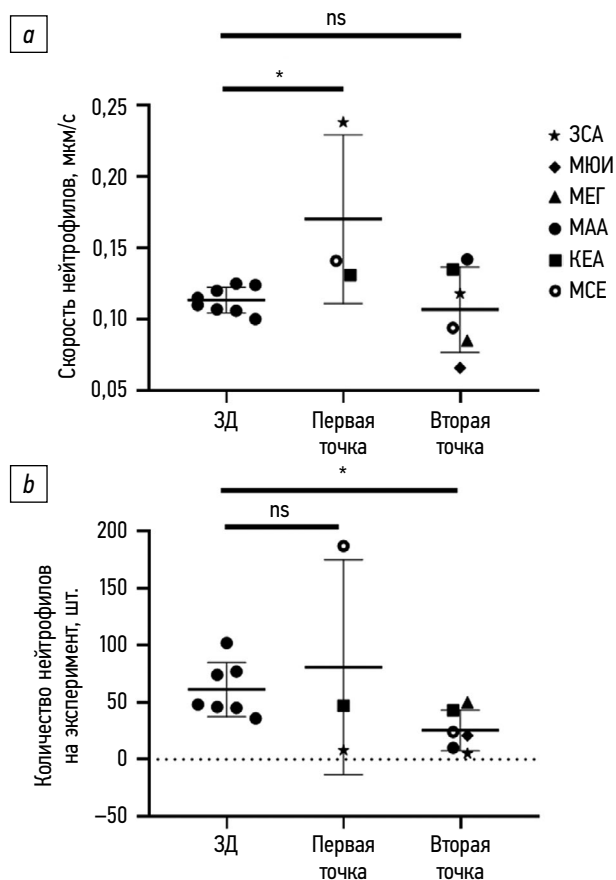


Рис. 2. Экспериментальная модель тромбовоспаления: *a* — средняя скорость движения нейтрофилов в эксперименте; *b* — количество нейтрофилов, адгезировавших к подложке в течение эксперимента. Для сравнения использован непараметрический тест Манна–Уитни. $*p < 0,05$.

Fig. 2. Experimental model of thromboinflammation: *a*, means the average neutrophil movement speed in the experiment; *b*, means the number of neutrophils adhering to the substrate during the experiment. For comparison purposes, the non-parametric Mann–Whitney test was used: $*p < 0.05$.

доноров. В образцах пациентки ЗСА, имевшей во время химиотерапии нейтропению, и до начала терапии наблюдались только единичные нейтрофилы в образце (рис. 2, *b*), что может говорить о влиянии онкологического процесса на состояние нейтрофилов. У пациенток МЮИ, КЕА и МEG на фоне терапии развился нейтроцитоз, при этом у МЮИ и МEG снижаются средние скорости движения нейтрофилов, что может говорить о взаимосвязи концентрации нейтрофилов в крови и состоянии их предактивации. При этом количество наблюдаемых в камере нейтрофилов для этих пациенток не изменено (см. рис. 2, *b*).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе оценивали состояние нейтрофилов пациентов с РМЖ. Впервые показано, что доля нейтрофилов, переходящих в нетоз, значимо повышена у всех пациентов, в то время как количество адгезионных нейтрофилов статистически значимо снижается на фоне терапии, несмотря на наблюдающийся у некоторых пациентов

нейтроцитоз. При этом средняя скорость движения нейтрофилов отличается от здоровых доноров как в большую, так и в меньшую сторону, что требует дальнейшего исследования.

Наблюдаемый повышенный уровень нетоза при контакте со стеклом клеток из периферической крови хорошо согласуется с данными о том, что при онкологических заболеваниях повышается уровень гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (G-CSF) в плазме крови [30, 36], который может способствовать активации/праймингу периферических нейтрофилов [37]. С другой стороны, активация нейтрофилов происходит при контакте с опухолью, и далее они могут возвращаться в кровотоки в процессе обратной миграции [38, 39]. Работы, проведенные на животных моделях рака, указывают на то, что рак делает нейтрофилы более предрасположенными к выделению NET, однако для пациентов данные противоречивы [20, 40, 41]. В настоящем исследовании мы показали, что у пациентов до начала терапии значимо повышен уровень нетоза, который далее у большинства пациенток снижается на фоне терапии G-CSF.

Важное наблюдение — заметное повышение уровня витального нетоза у пациенток, страдающих гипертонической болезнью (см. рис. 1, *b*). Этот результат согласуется с тем, что при гипертонии у мышей наблюдается именно PAD4-зависимый (витальный [18]) нетоз [42], а также с повышенным уровнем нетоза при гипертонической болезни [43]. Однако это одиночное наблюдение, и вопрос требует дальнейшего исследования. Общее повышение доли витального нетоза на фоне терапии (см. рис. 1, *c*) может говорить о благоприятном ее влиянии на прайминг нейтрофилов.

Нами также было показано нарушение скорости движения нейтрофилов по подложке: до начала терапии у пациентов наблюдалась сильная гетерогенность (см. рис. 2, *a*), что соответствует литературным данным [44]. После начала терапии у большинства пациентов снижалась скорость, при этом у двух из трех пациентов с нейтроцитозом, возможно связанным с эффектами G-CSF [45], скорость выходила за нижнюю границу нормы. Изменение подвижности нейтрофилов также может быть связано с эффектом G-CSF, так как данный фактор влияет на метаболизм нейтрофилов, в том числе на синтез аденозинтрифосфата [46]. Возможно, обратная миграция TAN также отражается на их способности к хемотаксису [47], как минимум при опухолевых заболеваниях наблюдается разделение нейтрофилов периферической крови на субпопуляции по плотности и функциям [48], так что в предлагаемом тесте, вероятно, наблюдается одна из субпопуляций. Кроме того, циклофосфамид [49] может приводить к праймингу нейтрофилов.

Так как известно, что доксорубин и циклофосфамид существенно влияют на количество и функционирование нейтрофилов [50], наблюдаемое изменение параметров может быть связано именно с данными препаратами. Наблюдаемое снижение активности нейтрофилов

может быть признаком вызываемой терапией нейтропатии [50, 51] и требует дальнейшего исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для такой патологии, как РМЖ целесообразно дальнейшее расширение исследования и поиск связи между клиническими исходами и функциональным состоянием нейтрофилов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Ю.Д.Д. Коробкина, Е.И.А. Адаманская — постановка экспериментов, обработка экспериментальных данных, анализ полученных данных, написание текста; Н.И. Польшина — ведение пациентов, разработка критериев включения и исключения пациентов, анализ полученных данных, внесение окончательной правки; С.В. Галкина — постановка экспериментов, анализ полученных результатов; Т.И. Кадыров — работа с данными пациентов, анализ полученных результатов; Н.П. Горбунов — выделение антител, анализ полученных результатов; А.В. Соколов, А.Н. Свешникова — концепция и дизайн исследования, анализ полученных результатов, внесение окончательной правки; Л.Г. Жукова — анализ полученных результатов, разработка критериев включения и исключения пациентов, внесение окончательной правки. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Этическая экспертиза. Исследование одобрено ЛЭК ГБУЗ МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ (протокол № 3/2023 от 28.02.2023). От всех доноров и пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании. Исследование и его протокол не регистрировали.

Согласие на публикацию. Авторы получили письменное информированное добровольное согласие пациентов и доноров на публикацию персональных данных в научном журнале, включая его электронную версию (дата подписания 28.10.2024).

Источники финансирования. Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 23-45-10039).

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье и в приложениях к ней.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали внешний и внутренний рецензенты.

Приложение 1. Репрезентативное изображение внеклеточных ДНК-ловушек нейтрофилов пациентов.
DOI: 10.17816/MAJ641688-4222132

Приложение 2. Репрезентативное видео тромбообразования у здорового донора. DOI: 10.17816/MAJ641688-4222133

Приложение 3. Репрезентативное видео тромбообразования у пациента. DOI: 10.17816/MAJ641688-4222134



ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: J.J.D. Korobkina, E.-I.A. Adamanskaya: experiment setting, experimental data processing, formal analysis, writing—original draft; N.I. Polshina: patient management, development of criteria for patient inclusion and removal, formal analysis, writing—review & editing; S.V. Galkina: experiment setting, formal analysis; T.I. Kadyrov: patient data curation, formal analysis; N.P. Gorbunov: antibody detection, formal analysis; A.V. Sokolov, A.N. Sveshnikova: study conceptualization and design, formal analysis, writing—review & editing; L.G. Zhukova: formal analysis, development of criteria for patient inclusion and removal, writing—review & editing. All authors approved the version of the manuscript to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of it are appropriately reviewed and resolved.

Ethics approval: The study was approved by the local Ethics Committee at the Loginov Moscow Clinical Scientific Center of the Moscow Healthcare Department (Protocol No. 3/2023 dated February 28, 2023). An informed consent to participate in the study was received from all donors and patients. The study and its protocol were not registered.

Consent for publication: A written informed consent was obtained from patients and donors for the publication of personal data in a scientific journal and its online version (signed on October 28, 2024).

Funding sources: The work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 23-45-10039).

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: The authors did not use any previously published information (text, illustrations, or data) in this work.

Data availability statement: All data generated during this study are available in the article and its supplementary materials.

Generative AI: Generative AI technologies were not used for this article creation.

Provenance and peer-review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The review process involved an external reviewer and an in-house reviewer.

Appendix 1. Representative Image of Extracellular DNA Traps of Neutrophils in Patients.

DOI: 10.17816/MAJ641688-4222132



Appendix 2. Representative Video of Blood Clots Development in Healthy Donor. DOI: 10.17816/MAJ641688-4222133



Appendix 3. Representative Video of Blood Clots Development in Patient. DOI: 10.17816/MAJ641688-4222134



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Singh N, Baby D, Rajguru J, et al. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med*. 2019;18(3):121–126. doi: 10.4103/aam.aam_56_18
- Doshi AS, Asrani KH. Innate and adaptive immunity in cancer. In: *Cancer Immunology and Immunotherapy*. Elsevier, 2022. P. 19–61.
- Wu M, Ma M, Tan Z, et al. Neutrophil: a new player in metastatic cancers. *Front Immunol*. 2020;11:565165. doi: 10.3389/fimmu.2020.565165
- Arpinati L, Shaul ME, Kaisar-Iluz N, et al. NETosis in cancer: a critical analysis of the impact of cancer on neutrophil extracellular trap (NET) release in lung cancer patients vs. mice. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(2):199–213. doi: 10.1007/s00262-019-02474-x
- Galdiero MR, Bianchi P, Grizzi F, et al. Occurrence and significance of tumor-associated neutrophils in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2016;139(2):446–456. doi: 10.1002/ijc.30076
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. 2009;16(3):183–194. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017
- Schaidt H, Oka M, Bogenrieder T, et al. Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. *Int J Cancer*. 2003;103(3):335–343. doi: 10.1002/ijc.10775
- Musiani P, Allione A, Modica A, et al. Role of neutrophils and lymphocytes in inhibition of a mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IFN- α , IFN- γ , and TNF- α . *Lab Invest*. 1996;74(1):146–157.
- Cupp MA, Cariolou M, Tzoulaki I, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and cancer prognosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies. *BMC Med*. 2020;18(1):360. doi: 10.1186/s12916-020-01817-1
- Taucher E, Taucher V, Fink-Neuboeck N, et al. Role of tumor-associated neutrophils in the molecular carcinogenesis of the lung. *Cancers*. 2021;13:5972. doi: 10.3390/cancers13235972
- Jin L, Kim HS, Shi J. Neutrophil in the pancreatic tumor microenvironment. *Biomedicines*. 2021;11:1170. doi: 10.3390/biom11081170
- Margaroli C, Cardenas MA, Jansen CS, et al. The immunosuppressive phenotype of tumor-infiltrating neutrophils is associated with obesity in kidney cancer patients. *Oncol Immunology*. 2020;9(1):1747731. doi: 10.1080/2162402X.2020.1747731
- Cerezo-Wallis D, Ballesteros I. Neutrophils in cancer, a love-hate affair. *FEBS J*. 2022;289(13):3692–3703. doi: 10.1111/febs.16022
- Shaul ME, Fridlender ZG. Cancer-related circulating and tumor-associated neutrophils – subtypes, sources and function. *FEBS J*. 2018;285(23):4316–4342. doi: 10.1111/febs.14524
- Gungabeesoon J, Gort-Freitas NA, Kiss M, et al. A neutrophil response linked to tumor control in immunotherapy. *Cell*. 2023;186(7):1448–1464.e20. doi: 10.1016/j.cell.2023.02.032
- Sveshnikova AN, Adamanskaya EA, Pantelev MA. Conditions for the implementation of the phenomenon of programmed death of neutrophils with the appearance of DNA extracellular traps during thrombus formation. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*. 2024;23(1):211–218. EDN: UQHWLZ doi: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-211-218
- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):134–147. doi: 10.1038/nri.2017.105
- Sveshnikova AN, Adamanskaya EA, Korobkina Yu-DD, Pantelev MA. Intracellular signaling involved in the programmed neutrophil cell death leading to the release of extracellular DNA traps in thrombus formation. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*. 2024;23(2):222–230. doi: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-222-230
- Shahzad MH, Feng L, Su X, et al. Neutrophil extracellular traps in cancer therapy resistance. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5):1359. doi: 10.3390/cancers14051359
- Martins-Cardoso K, Almeida VH, Bagri KM, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) promote pro-metastatic phenotype in human breast cancer cells through epithelial-mesenchymal transition. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1542. doi: 10.3390/cancers12061542
- Poto R, Cristinziano L, Modestino L, et al. Neutrophil extracellular traps, angiogenesis and cancer. *Biomedicines*. 2022;10:431. doi: 10.3390/biomedicines10020431
- Gao F, Feng Y, Hu X, et al. Neutrophils regulate tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma and the role of Chemerin. *Int Immunopharmacol*. 2023;121:110540. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110540
- Kaltenmeier C, Yazdani HO, Morder K, et al. Neutrophil extracellular traps promote T cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2021;12:785222. doi: 10.3389/fimmu.2021.785222
- Cives M, Pelle' E, Quaresmini D, et al. The tumor microenvironment in neuroendocrine tumors: biology and therapeutic implications. *Neuroendocrinology*. 2019;109(2):83–99. doi: 10.1159/000497355

25. Kou M, Lu W, Zhu M, et al. Massively recruited sTLR9⁺ neutrophils in rapidly formed nodules at the site of tumor cell inoculation and their contribution to a pro-tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*. 2023;72(8):2671–2686. doi: 10.1007/s00262-023-03451-1
26. Mizuno R, Kawada K, Itatani Y, et al. The role of tumor-associated neutrophils in colorectal cancer. *IJMS*. 2019;20(3):529. doi: 10.3390/ijms20030529
27. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–249. doi: 10.3322/caac.21660
28. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(5):dju055. doi: 10.1093/jnci/dju055
29. Soto-Perez-de-Celis E, Chavarri-Guerra Y, Leon-Rodriguez E, Gamboa-Dominguez A. Tumor-associated neutrophils in breast cancer subtypes. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(10):2689–2694. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.10.2689
30. Sheng Y, Peng W, Huang Y, et al. Tumor-activated neutrophils promote metastasis in breast cancer via the G-CSF-RLN2-MMP-9 axis. *J Leukoc Biol*. 2023;113(4):383–399. doi: 10.1093/jleuko/qiad004
31. Morozova DS, Martynov AA, Obyednyy SI, et al. Ex vivo observation of granulocyte activity during thrombus formation. *BMC Biol*. 2022;20(1):32. doi: 10.1186/s12915-022-01238-x
32. Korobkin JD, Deordieva EA, Tesakov IP, et al. Dissecting thrombus-directed chemotaxis and random movement in neutrophil near-thrombus motion in flow chambers. *BMC Biol*. 2024;22(1):115. doi: 10.1186/s12915-024-01912-2
33. Adamanskaya EA, Yushkova EB, Fedorova DV, et al. Methodology for observing neutrophil DNA traps in blood samples of pediatric patients. In: *Collection of abstracts of the XXIV congress of the I. P. Pavlov Physiological Society*. Saint Petersburg; 2023. P. 127. EDN: WZIHVS (In Russ.)
34. Sokolov AV, Ageeva KV, Kostevich VA, et al. Study of interaction of ceruloplasmin with serprocidins. *Biochemistry (Moscow)*. 2010;75(11):1361–1367. EDN: OACVTD. doi: 10.1134/S0006297910110076
35. Sokolov AV, Acquasaliente L, Kostevich VA, et al. Thrombin inhibits the anti-myeloperoxidase and ferroxidase functions of ceruloplasmin: relevance in rheumatoid arthritis. *Free Radic Biol Med*. 2015;86:279–294. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.016
36. Groblewska M, Mroczko B, Wereszczyńska-Siemiątkowska U, et al. Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in pancreatic cancer patients. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(1):30–34. doi: 10.1515/CCLM.2007.025
37. Schoergenhofer C, Schwameis M, Wohlfarth P, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) increases histone-complexed DNA plasma levels in healthy volunteers. *Clin Exp Med*. 2017;17(2):243–249. doi: 10.1007/s10238-016-0413-6
38. Xu Q, Zhao W, Yan M, Mei H. Neutrophil reverse migration. *J Inflamm (Lond)*. 2022;19(1):22. doi: 10.1186/s12950-022-00320-z
39. Patel S, Fu S, Mastio J, et al. Unique pattern of neutrophil migration and function during tumor progression. *Nat Immunol*. 2018;19:1236–1247. doi: 10.1038/s41590-018-0229-5
40. Thiam HR, Wong SL, Qiu R, et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;117(13):7326–7337. doi: 10.1073/pnas.1909546117
41. Thälin C, Lundström S, Seignez C, et al. Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PLoS One*. 2018;13:e0191231. doi: 10.1371/journal.pone.0191231
42. Krishnan J, Hennen EM, Ao M, et al. NETosis drives blood pressure elevation and vascular dysfunction in hypertension. *Circ Res*. 2024;134(11):1483–1494. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.323897
43. Li J-H, Tong D-X, Wang Y, et al. Neutrophil extracellular traps exacerbate coagulation and endothelial damage in patients with essential hypertension and hyperhomocysteinemia. *Thromb Res*. 2021;197:36–43. doi: 10.1016/j.thromres.2020.10.028
44. Liu S, Wu W, Du Y, et al. The evolution and heterogeneity of neutrophils in cancers: origins, subsets, functions, orchestrations and clinical applications. *Mol Cancer*. 2023;22:148. doi: 10.1186/s12943-023-01843-6
45. Tamura M, Hattori K, Nomura H, et al. Induction of neutrophilic granulocytosis in mice by administration of purified human native granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;142(2):454–460. doi: 10.1016/0006-291X(87)90296-8
46. Jun HS, Lee YM, Song KD, et al. G-CSF improves murine G6PC3-deficient neutrophil function by modulating apoptosis and energy homeostasis. *Blood*. 2011;117(14):3881–3892. doi: 10.1182/blood-2010-08-302059
47. Yang Y, Yang J, Li L, et al. Neutrophil chemotaxis score and chemotaxis-related genes have the potential for clinical application to prognosticate the survival of patients with tumours. *BMC Cancer*. 2024;24:1244. doi: 10.1186/s12885-024-12993-1
48. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*. 2015;10(4):562–573. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.039
49. Koyama S, Takamizawa A, Sato E, et al. Cyclophosphamide stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemoattractants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(6):L1203–L1211. doi: 10.1152/ajplung.2001.280.6.L1203
50. Palukuri NR, Yedla RP, Bala SC, et al. Incidence of febrile neutropenia with commonly used chemotherapy regimen in localized breast cancer. *South Asian J Cancer*. 2020;9(1):4–6. doi: 10.4103/sajc.sajc_439_18
51. Katsifis GE, Tzioufas AG, Vlachoyiannopoulos PG, et al. Risk of myelotoxicity with intravenous cyclophosphamide in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(7):780–786. doi: 10.1093/rheumatology/41.7.780

ОБ АВТОРАХ

Коробкина Юлия Джессика Дмитриевна;

ORCID: 0000-0002-2762-5460;

eLibrary SPIN: 6630-3657;

e-mail: juliajessika@gmail.com

Адаманская Екатерина-Ива Александровна;

ORCID: 0009-0000-4828-4063;

eLibrary SPIN: 9633-1147;

e-mail: ka.09@mail.ru

Польшина Наталья Ивановна;

ORCID: 0000-0001-5417-0425;

e-mail: npolshina@yandex.ru

AUTHORS INFO

Julia Jessica D. Korobkina;

ORCID: 0000-0002-2762-5460;

eLibrary SPIN: 6630-3657;

e-mail: juliajessika@gmail.com

Ekaterina-Iva A. Adamanskaya;

ORCID: 0009-0000-4828-4063;

eLibrary SPIN: 9633-1147;

e-mail: ka.09@mail.ru

Natalya I. Polshina, MD;

ORCID: 0000-0001-5417-0425;

e-mail: npolshina@yandex.ru

Галкина София Владимировна;

ORCID: 0009-0006-6321-4489;

e-mail: s_v_galkina@rambler.ru

Кадыров Тимур Ильдарович;

ORCID: 0009-0005-0130-1758;

e-mail: kadyrov.ti17@physics.msu.ru

Горбунов Николай Петрович;

ORCID: 0000-0003-4636-0565;

eLibrary SPIN: 6289-7281;

e-mail: niko_laygo@mail.ru

Соколов Алексей Викторович, д-р биол. наук;

ORCID: 0000-0001-9033-0537;

eLibrary SPIN: 7427-7395;

e-mail: biochemsokolov@gmail.com

Жукова Людмила Григорьевна, д-р мед. наук;

ORCID: 0000-0003-4848-6938;

eLibrary SPIN: 2177-6476;

e-mail: zhukova.lyudmila008@mail.ru

*** Свешникова Анастасия Никитична, д-р физ.-мат. наук;**

адрес: Россия, 109029, Москва,

ул. Средняя Калитниковская, д. 30;

ORCID: 0000-0003-4720-7319;

eLibrary SPIN: 7893-4627;

e-mail: ASve6nikova@yandex.ru

Sofia V. Galkina;

ORCID: 0009-0006-6321-4489;

e-mail: s_v_galkina@rambler.ru

Timur I. Kadyrov;

ORCID: 0009-0005-0130-1758;

e-mail: kadyrov.ti17@physics.msu.ru

Nikolay P. Gorbunov;

ORCID: 0000-0003-4636-0565;

eLibrary SPIN: 6289-7281;

e-mail: niko_laygo@mail.ru

Alexey V. Sokolov, Dr. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0001-9033-0537;

eLibrary SPIN: 7427-7395;

e-mail: biochemsokolov@gmail.com

Lyudmila G. Zhukova, MD, Dr. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0003-4848-6938;

eLibrary SPIN: 2177-6476;

e-mail: zhukova.lyudmila008@mail.ru

*** Anastasia N. Sveshnikova, Dr. Sci. (Physics and Mathematics);**

address: 30 Srednyaya Kalitnikovskaya st,

Moscow, 109029, Russia;

ORCID: 0000-0003-4720-7319;

eLibrary SPIN: 7893-4627;

e-mail: ASve6nikova@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author