

## **Ферментативная активность сыворотки крови, абзимная активность IgG и IgA, свободная сывороточная ДНК и образование внеклеточных ловушек нейтрофилами у пациенток с новообразованиями молочной железы**

С.В. Жерулик, Н.Г. Луд, С.И. Генералов, Е.Г. Орлова, И.И. Генералов

Витебский государственный медицинский университет

## **Enzymatic activity of blood serum, abzyme activity of IgG and IgA, free serum DNA and the formation of extracellular traps by neutrophils in patients with breast neoplasms**

S.V. Zherulik, N.G. Lud, S.I. Generalov, E.G. Orlova, I.I. Generalov

Vitebsk State Medical University

### **Аннотация**

Целью настоящего исследования явилась комплексная сравнительная оценка протеолитической, нуклеазной и оксидоредуктазной активности сывороток и иммуноглобулинов классов G и A, определение свободной ДНК в сыворотке крови и установление способности лейкоцитов к образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) у пациенток с новообразованиями молочной железы.

Для осуществления поставленной цели были разработаны следующие методы: комбинированный способ выделения ИГ классов G и A из одного образца сыворотки крови, метод флюоресцентного определения сывороточной ДНК, метод окраски НВЛ в культуре нейтрофилов метиловым зеленым и метод двойного окрашивания НВЛ в мазках-отпечатках опухоли.

По результатам исследования показано, что выделенные из сыворотки крови абзимы проявляют протеолитическую, ДНКазную и оксидоредуктазную активность, которая изменяется в зависимости от пациента и условий постановки реакции. Отдельные виды каталитической активности сывороток и антител различаются у пациенток со злокачественными и доброкачественными опухолями молочной железы и у здоровых лиц. Каталитическая активность сывороток и абзимов зависит от распространенности опухолевого процесса, гистологических и иммуногистохимических характеристик опухоли.

Содержание сывороточной ДНК при раке молочной железы снижается в сравнении со здоровыми лицами; установлена отрицательная корреляция между содержанием ДНК и ДНКазной активностью сывороток и абзимов.

### **Summary**

The objective of this study included a comprehensive comparative assessment of the proteolytic, nuclease and oxidoreductase activity of serum and immunoglobulins of G and A classes, as well as the serum DNA content in patients with mammary neoplasms and the ability of their leukocytes to form neutrophil extracellular traps (NETs).

To aim this, the following methods have been developed: a combined method for isolating IgG and IgA from a single serum sample, the method for fluorescent determination of serum DNA, the method of staining NETs in the culture of neutrophils with methyl green, and the method of double staining of NETs in tumor smear-imprints.

Based on the results of the study it was shown that the abzymes isolated from blood serum possess proteolytic, DNase and oxidoreductase activity, which varies depending on the patient and the conditions of the reaction. Certain types of catalytic activity of serum and antibodies are different in patients with malignant and benign breast tumors, as well as in healthy individuals. Catalytic activity of serum and abzymes depends on the tumor grade as well as on histological and immunohistochemical characteristics of the tumor.

Concentration of DNA in serum of breast cancer patients is reduced in comparison with healthy individuals; a negative correlation was established between the DNA content and DNase activity of sera and abzymes.

The ability to form traps by neutrophils in breast cancer is significantly higher in comparison with the examined control groups (patients with benign breast tumors and healthy individuals). This finding may be used as an additional

Способность к ловушкообразованию у нейтрофилов при раке молочной железы достоверно выше в сравнении с обследованными контрольными группами (пациентки с доброкачественными образованиями молочной железы; здоровые лица). Данный показатель может явиться дополнительным лабораторным маркером развития опухолевого процесса в молочной железе у женщин.

### **Ключевые слова**

Рак молочной железы, абзимы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, ферментативная сывороточная активность

### **Актуальность работы**

Рак молочной железы – одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний. По частоте он занимает первое место среди злокачественных новообразований у женщин и второе во всей популяции, уступая лишь раку легких.

С середины прошлого века интенсивно изучается влияние системы иммунитета на развитие опухолей различного происхождения, включая рак молочной железы [1]. Выдвинута концепция иммунологического регулирования опухолевой прогрессии [2].

Наряду с иммунологическими показателями, у пациентов с онкопатологией активно исследуется содержание сывороточной ДНК. Устанавливается ее значение в диагностике опухолей и в оценке эффективности назначаемых цитостатических препаратов [3].

Одной из причин колебаний концентрации циркулирующих нуклеиновых кислот является изменение нуклеазной активности сывороточных ферментов. Сывороточная ДНКазы неоднократно изучалась как перспективный диагностический показатель при выявлении злокачественных новообразований; также она использовалась в контроле эффективности противоопухолевой терапии, раннем обнаружении рецидивов и метастазирования [4].

В последних исследованиях было установлено, что в суммарной ферментативной активности сывороток значимой является доля абзимной активности. Абзимная активность оценивалась при патологии щитовидной железы, системных заболеваниях соединительной ткани, ревматоидном артрите, болезнях желудочно-кишечного тракта и др. [5, 6, 7, 8, 9, 10]. Однако изучению действий абзимов при опухолях посвящены лишь единичные публикации [11, 12].

Нейтрофильные гранулоциты и нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) являются

laboratory marker of the development of the tumor process in the mammary gland in women.

### **Key words**

Breast cancer, abzymes, neutrophil extracellular traps, enzymatic serum activity

постоянной структурой в микроокружении опухолей; их роль в онкогенезе неоднозначна [14, 15, 16] Согласно некоторым данным, они захватывают циркулирующие опухолевые клетки, способствуя метастазированию [17].

Таким образом, учитывая полиморфизм рака молочной железы и многочисленные, до конца не известные, механизмы его развития, исследование новых иммунологических и биохимических особенностей данной патологии имеет важное значение для понимания патогенеза заболевания и возможности его диагностики и терапии.

### **Методы исследований**

Материалом для исследования послужили кровь и сыворотка 66 пациенток со злокачественными новообразованиями молочной железы (ЗНО), 26 пациенток с доброкачественными новообразованиями молочной железы (фиброаденома, ФА) и 12 здоровых женщин (контрольная группа, КГ). Из полученных сывороток выделяли иммуноглобулины классов IgG и IgA, из крови – культуры гранулоцитов.

Обследование пациенток и лиц контрольной группы проводилось согласно алгоритмам диагностики и лечения злокачественных новообразований, утвержденным приказом МЗ РБ №258 от 10.03.2012.

В работе использовались реагенты и субстраты для определения сывороточной и абзимной каталитической активности (все – производства Sigma, США); красители и реагенты для определения ДНК и нейтрофильных внеклеточных ловушек (производства Roth, Германия, Invitrogen и Sigma, США); аффинные матрицы для выделения IgG и IgA (Pierce и Sigma, США); реагенты для электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГ) – Sigma, США. При постановке иммунологических методов применяли антисыворотки к сывороточным ИГ классов G, A, M производ-

ства РНИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (РФ, Москва). Остальные реактивы – отечественного производства и перефасовки квалификации "хч" и "чда".

При исследовании сывороточной и абзимной каталитической активности забор крови для анализа осуществлялся из локтевой вены, в утренние часы, натощак, не ранее, чем через 8 часов после приема пищи.

Одновременное выделение иммуноглобулинов класса А и G из образцов сыворотки крови проводили по предложенному нами ранее способу [18] с включением ряда дополнительных стадий для эффективного разделения IgG и IgA.

Итоговый метод включал в себя следующие этапы.

1. Преципитация сыворотки крови 40% сульфатом аммония с последующим растворением преципитата в 0,02 М ФБР на 0,15М NaCl pH 7,4.
2. Последовательная аффинная хроматография проб на колонке с рекомбинантным протеином А золотистого стафилококка и на колонке с агарозой, конъюгированной с антителами против тяжелой цепи общих IgA человека.
3. Элюция ИГ с колонок с помощью 0,1 М глицин-HCl буфера, pH 2,8 с последующей нейтрализацией образцов.
4. Дополнительная ионообменная хроматография фракции IgG на анионообменной DEAE-матрице с выходом IgG в свободном объеме.

Наличие белка в пробах определяли с помощью микромодификации метода Бредфорд-Седмака [19].

Фракции, содержащие наиболее высокие концентрации белка, объединяли. Концентрацию иммуноглобулинов определяли спектрофотометрией при 280 нм (коэффициент перевода единиц экстинкции в концентрации ИГ (мг/мл) для IgA равен 0,76; для IgG – 0,71). Итоговые концентрации иммуноглобулинов в пробах варьировали в пределах 1,5±0,67 мг/мл для IgG и 0,16±0,13 мг/мл для IgA. Выделенные образцы ИГ хранили в пластиковых пробирках при температуре -20°C.

Иммунохимическая чистота ИГ была подтверждена методом иммунодиффузии по Оухтерлони. В результате обнаружена одна полоса преципитации для каждого класса иммуноглобулинов. Контроль гомогенности фракций полученных препаратов ИГ проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (Sigma) в системе буферов по Laemmli с использованием 5% стартового геля и 10% разделяющего геля в присутствии додецилсульфата натрия. Гель окрашивали Кумасси R250. По результатам

электрофореза различных образцов IgA и IgG сыворотки крови, без добавления 5% раствора меркаптоэтанола, обнаруживалась одна белковая полоса, мигрирующая в зоне гамма-глобулинов, что подтверждает их гомогенность.

ДНКазную активность сывороток и ИГ определяли по методу риванолового сгустка. Исследование сывороточной ДНКазной активности проводилось в трех температурных режимах согласно [20]: 1-й режим – стандартный (инкубация реакционной смеси проводилась 2 часа при температуре 37°C); 2-й режим – повышенный (инкубация 2 часа при температуре 50°C); 3-й режим – комбинированный (инкубация разведенной сыворотки с буферным раствором в течение 30 минут при температуре 50°C, затем пробы охлаждали до 37°C, добавляли раствор ДНК и далее инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C). Оценка результатов реакции проводилась по 6-балльной шкале [21].

Определение протеолитической (БАПНА-амидазной и катепсиноподобной) и оксидоредуктазной (пероксидазной, каталазной) активности сывороток и ИГ проводили согласно [21]. Результаты выражали в единицах активности, соответствующих оптической плотности. Для IgG конечная концентрация во всех реакциях составляла 1 мг/мл, для IgA 100 мкг/мл.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакетов программ STATISTICA v.10.0, Statgraphics Centurion XVI (trial version) и MedCalc. В зависимости от характера распределения изучаемых величин применялись методы параметрической или непараметрической статистики (критерии Краскела-Уоллиса, Манна-Уитни, Вилкоксона, хи-квадрат).

## Результаты и обсуждение

### 1. Оценка сывороточной нуклеазной, протеолитической и оксидоредуктазной активности

Результаты определения нуклеазной, протеолитической и оксидоредуктазной активности сыворотки крови пациентов с новообразованиями молочной железы и здоровых лиц представлены в таблице 1.

Проведено сравнение уровней активности между группами ЗНО, ФА и КГ; дополнительно исследовали показатели ферментативной сывороточной активности в группе пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы в зависимости от возраста (возрастная

**Таблица 1. Сывороточная ферментативная активность в группах пациенток с новообразованиями молочной железы и здоровых лиц**

	1. ЗНО		2. ФА		3. КГ	
	n	Me (25%; 75%)	n	Me (25%; 75%)	n	Me (25%; 75%)
БАПНА-амидазная активность	66	0,138 (0,095; 0,206)	25	0,117 (0,091; 0,152)	12	0,197 (0,138; 0,235)
Активность катепсина В	63	0,442* (0,330; 0,543)	26	0,336 (0,286; 0,386)	12	0,376 (0,242; 0,498)
Активность катепсина G	63	0,147* (0,095; 0,180)	25	0,109 (0,076; 0,132)	12	0,129 (0,084; 0,166)
ДНКазная активность:		3,0*		2,3		2,5
1-й режим		(2,0; 4,5)		(1,5; 3,5)		(2,0; 3,5)
2-й режим		5,0		5,0		5,0
3-й режим	66	(4,5; 5,0) 4,0*# (2,5; 5,0)	26	(4,5; 5,0) 3,0 (2,0; 4,5)	12	(4,5; 5,0) 3,0 (2,0; 4,0)
Пероксидазная активность	52	1,319# (0,884; 1,874)	25	1,181^ (0,929; 1,553)	11	1,988 (1,647; 2,570)
Каталазная активность	66	66,01% (51,81%; 86,55%)	26	72,99% (55,47%; 89,88%)	11	71,23% (52,20%; 90,35%)

Примечание: \* – отличия достоверны между 1 и 2 группами, # – между 1 и 3 группами; ^ – между 2 и 3 группами

структура согласно ВОЗ), состояния репродуктивной системы, стадии заболевания и гистологических характеристик опухоли (полученные данные приведены ниже).

### 1.1. ДНКазная активность сыворотки крови

Исследование ДНКазной активности проводилось в трех температурных режимах. Было выявлено, что с повышением температуры активность сывороточного фермента нарастает во всех обследованных группах (см. табл. 1). Оказалось также, что при 3-м температурном режиме сывороточная ДНКазная активность пациенток со злокачественными новообразованиями (ЗНО) достоверно выше, чем в остальных изученных группах (ФА и КГ,  $p < 0,05$ ).

При сравнении ДНКазной сывороточной активности в группах злокачественных, доброкачественных опухолей и здоровых лиц, было выявлено нарастание активности от здоровых к больным. При 1-ом режиме группа ЗНО проявляет статистически значимое увеличение активности по сравнению с группой ФА ( $p < 0,05$ ). При третьем температурном режиме наблюдаются статистически значимые различия, как между группами ЗНО и ФА, так и КГ ( $p < 0,05$ ).

При стандартном температурном режиме ( $37^{\circ}\text{C}$ ) с увеличением размера первичной опухоли активность ДНКазы сыворотки нарастала

( $p < 0,05$ ). Также наблюдалась тенденция к росту ДНКазной активности при поражении регионарных лимфатических узлов ( $p = 0,08$ ).

### 1.2. Протеолитическая активность сыворотки крови

Согласно табл. 1, БАПНА-амидазная активность статистически значимо не различается между группами пациенток со злокачественными и доброкачественными новообразованиями и здоровых лиц ( $p > 0,05$ ), однако она была связана с гистологическим типом опухоли – уровень активности при протоковом раке достоверно ниже, чем при других типах опухолей ( $p < 0,05$ ).

Кроме того, было показано, что БАПНА-амидазная активность сыворотки не отражает размер первичной опухоли, ее степень дифференцировки, иммуногистохимический тип и пролиферативную активность, однако она возрастает  $\approx$  на 30% при распространении опухоли на регионарные лимфатические узлы ( $p < 0,05$ ).

Сывороточная активность катепсина В в среднем на 30% выше у пациенток со злокачественными новообразованиями молочной железы, чем у пациенток с фиброаденомами ( $p < 0,05$ ). Различия между группой здоровых лиц и ЗНО оказались статистически недостоверными, однако также можно наблюдать некоторое снижение активности у здоровых лиц (до 18%). При сопостав-

лении уровней активности с гистологической структурой опухоли протоковый рак отличался заметным снижением активности по сравнению с другими типами опухолей ( $p < 0,05$ ).

Активность катепсина G в группе ЗНО выше, чем в группе доброкачественных опухолей ( $p < 0,05$ ), однако достоверных отличий с группой здоровых лиц не выявлено. Активность катепсина G отражает иммуногистохимическую структуру опухоли и ее пролиферативную активность. Так, она статистически значимо увеличивалась от гормонопозитивных к трижды негативным опухолям и от опухолей с низкой пролиферативной активностью к опухолям с высокой степенью пролиферации ( $p < 0,05$ ).

### 1.3. Оксидоредуктазная активность сыворотки крови

Пероксидазная активность сыворотки крови статистически значимо снижается при развитии патологии молочной железы ( $p < 0,05$ ). Наблюдается тенденция к ее снижению при увеличении пролиферативной активности опухоли. Также наблюдался статистически значимый рост пероксидазной активности при снижении степени дифференцировки опухоли ( $p < 0,01$ ).

Каталазная активность сыворотки крови имеет высокие значения как в группах пациенток с новообразованиями молочной железы, так и у здоровых лиц. Статистически значимых различий между группами выявлено не было.

### 1.4. Корреляционный анализ различных видов сывороточной ферментативной активности

Проведена оценка корреляции различных видов сывороточной ферментативной активности с возрастом пациенток, размером опухоли, ее распространенностью и гистологической структурой в группе злокачественных новообразований молочной железы.

Выявлена умеренная положительная корреляция сывороточной БАПНА-амидазной активности и гистологической структуры опухоли, а также степени ее дифференцировки ( $r = 0,304$  и  $r = 0,386$ , соответственно,  $p < 0,05$ ). Также БАПНА-амидазная активность сыворотки умеренно положительно коррелирует с уровнями сывороточных катепсинов B и G ( $r = 0,378$  и  $r = 0,409$ ;  $p < 0,05$ ) и с уровнем гемоглобина ( $r = 0,351$ ,  $p < 0,05$ ).

Активность катепсина B умеренно положительно коррелирует с активностью катепсина G ( $r = 0,573$ ,  $p < 0,05$ ) и отрицательно с сывороточной каталазной активностью ( $r = -0,313$ ,  $p < 0,05$ ).

Активность катепсина G умеренно положительно коррелирует с уровнем пролиферативной активности Ki-67 опухоли ( $r = 0,365$ ,  $p < 0,05$ ).

ДНКазная активность проявляет взаимосвязь с распространенностью онкологического процесса. Так, уровень ДНКазной активности умеренно положительно коррелирует с размером первичной опухоли ( $r = 0,412$ ,  $p < 0,05$ ). Наблюдается корреляция с гистологической структурой опухоли и ее пролиферативной активностью ( $r = 0,258$  и  $r = 0,320$ , соответственно,  $p < 0,05$ ). Выявлена умеренная положительная корреляция между ДНКазной активностью, уровнем общего белка сыворотки крови и уровнем СОЭ ( $r = 0,348$  и  $r = 0,347$ , соответственно,  $p < 0,05$ ).

### 2. Разработка метода определения ДНК в сыворотке в реакции с флюорохромом PicoGreen

Для количественного определения ДНК сыворотки была разработана методика определения концентрации ДНК в реакции с красителем PicoGreen с помощью предложенного нами светодиодного устройства для регистрации флюоресценции.

Реакцию выполняли в 96-луночном полистироловом планшете. Для построения калибровочной кривой растворы ДНК в разных концентрациях (от 40 до 7500 нг/мл) и 0,5 мкл красителя PicoGreen смешивались в конечном объеме 0,2 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера (ФБР) pH 7,4 непосредственно перед визуализацией. Возбуждение флюоресценции выполняли с помощью сконструированной нами светодиодной панели, включающей 8 синих светодиодов с узкополосным излучением (465-470 нм) [21].

Цифровое изображение результатов реакции получали с помощью камеры Canon G10 при съемке лунок планшета через оранжевый светофильтр. Полученные цифровые снимки в формате jpg переносили на персональный компьютер и обрабатывали программой ImageJ (NIH, США). Этапы обработки включали получение 8-битного изображения в градациях серого цвета и выделение в изображении областей интереса, соответствующих середине лунок планшета, содержащих комплекс «ДНК-флюорохром». На последнем этапе подключали плагин анализа с построением графика изменения яркости лунок (от 0 до 255) в зависимости от концентрации ДНК. Воспроизводимость определения ДНК данным способом составила 5-7%, чувствительность – до 10 нг/мл/. После построения калибровочной кривой было по-

лучено уравнение регрессии для определения концентрации ДНК в пробе:

$$C = (0,3 * X - 8,4)^2$$

где: X – яркость лунки, 0,3 и -8,4 – коэффициенты регрессии.

Для определения концентрации ДНК в исследуемых образцах сыворотки пациенток с новообразованиями молочной железы и здоровых лиц в лунку 8-луночного стрипа вносилось 0,1 мл сыворотки в разведении 1:5 и 0,1 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера (ФБР) pH 7,4. Непосредственно перед исследованием в каждую лунку добавляли 0,5 мкл раствора PicoGreen, инкубировали в течение 5 минут в темноте. Для контроля спонтанной флюоресценции сыворотки в соседние лунки вносили сывороточно-буферную смесь без флюорохрома. Регистрировали и оценивали результаты как описано выше.

### 3. Оценка концентрации свободной ДНК в сыворотках крови пациенток с новообразованиями молочной железы и здоровых лиц

Концентрация ДНК оказалась достоверно ниже в группе ЗНО по сравнению с ФА и КГ ( $p < 0,01$ ) (табл. 2).

При анализе группы ЗНО выявлены различия в зависимости от гистологической структуры опухоли – содержание ДНК в сыворотке статистически значимо повышается при протоковом раке в отличие от долькового и неспецифического (увеличение до 2-х раз,  $p < 0,05$ ). Также содержание ДНК статистически значимо ниже при низкой пролиферативной активностью в сравнении с умеренной и высокой ( $p < 0,05$ ). Содержание ДНК в сыворотке крови отрицательно коррелирует с ДНК-расщепляющей активностью сывороток и антител ( $p < 0,05$ ).

### 4. Абзимная активность иммуноглобулинов классов G и A

#### 4.1. Параметры каталитической активности поликлональных IgG и IgA

В результате проведенных экспериментов оказалось, что в крови пациенток с новообразованиями молочной железы, а также здоровых лиц присутствуют абзимы классов IgG и IgA, обладающие нуклеазной (ДНКазной), протеолитической БАПНА-амидазной и катепсиноподобной (катепсин G) и оксидоредуктазной (каталазной) активностями.

Предварительными исследованиями было установлено, что абзимная активность в отношении субстратов эластазы, катепсинов B и

C, а также активность абзимной пероксидазы в большинстве случаев незначительна, поэтому в дальнейшем постановка данных реакций не производилась.

Изучение параметров абзимных реакций выявило, что степень превращения субстрата пропорциональна времени инкубации. В большинстве случаев зависимость имела линейный характер.

Также было изучено влияние pH на основные типы реакций, катализируемых абзимами. Каталазную, БАПНА-амидазную и катепсиноподобную (катепсин G) абзимные реакции определяли в буферных растворах: 0,1 М глицин-HCl-буфере pH 2,8; 0,05 М ацетатном буфере pH 4,0-5,0-6,0; 0,05 М трис-HCl буфере pH 7,0-8,0-9,0. Из полученных результатов следует, что образцы IgA и IgG с активностью катепсина G имеют один оптимум pH в щелочной зоне, что соответствует активности сериновых протеаз. Для препаратов IgA и IgG с БАПНА-амидазной активностью определяются два невыраженных максимума в щелочной зоне при pH 7 и 9. Оптимум каталазной активности имеет пологую форму и захватывает слабощелочной и щелочной pH. Эти данные совпадают с нашими предыдущими результатами, полученными на примере абзимной активности IgA ротовой жидкости у пациентов с патологией периодонта [21], а также с данными группы Г.А. Невинского относительно выраженной гетерогенности поликлонального абзимного катализа при аутоиммунной патологии [23].

#### 4.2. Определение абзимной активности IgG и IgA, выделенных из крови пациенток с новообразованиями молочных желез и здоровых лиц

##### 4.2.1. ДНКазная активность поликлональных ИГ класса G и A

Статистически значимых различий между группами по ДНКазной активности IgG и IgA выявлено не было. Активность IgG росла при увеличении стадии заболевания ( $p < 0,05$ ). Такая же тенденция наблюдается и в зависимости от размера первичной опухоли. ДНКазная активность IgG при протоковом раке ниже в сравнении с дольковым и неспецифическим раком ( $p < 0,05$ ). Различий по иммуногистохимической структуре, пролиферативной активности, распространенности опухоли на лимфатические узлы для ДНКазной активности IgG не выявлено.

При исследовании ДНКазной активности иммуноглобулинов класса A установлены статистически значимое снижение активности при

**Таблица 2. Содержание свободной ДНК в сыворотках**

	ЗНО		ФА		КГ	
	n	Me (25%; 75%)	n	Me (25%; 75%)	n	Me (25%; 75%)
Концентрация ДНК, нг/мл	63	119,653 (75,627; 161,035)	26	141,334 (117,990; 189,071)	12	168,771 (135,171; 208,355)

поражении регионарных лимфатических узлов ( $p < 0,05$ ). Протоковый рак, так же, как и в случае IgG, отличается более низкой активностью, чем другие гистологические типы опухоли.

#### 4.2.2. Протеолитическая активность каталитических ИГ

Выявлено, что статистически значимые различия между группами имеются только для БАПНА-амидазной активности IgA – в группе пациентов со злокачественными опухолями активность значительно ниже, чем в группе доброкачественных новообразований и здоровых лиц ( $p < 0,05$ ).

При оценке БАПНА-амидазной активности ИГ класса G было обнаружено, что ее значения при протоковом раке ниже, чем при других гистологических типах опухоли. Также активность IgG снижается при высокой пролиферативной активности опухоли ( $p < 0,05$ ). При увеличении опухоли свыше 2 см в диаметре снижается и активность IgA ( $p < 0,05$ ).

С другой стороны, катепсиноподобная активность IgG и IgA при протоковом раке выше, чем при других типах опухолей ( $p < 0,05$ ). Для IgG она также связана с пролиферативной активностью раковых клеток, становясь минимальной при низкой пролиферативной активности опухоли ( $p < 0,05$ ).

Проведена оценка корреляции активностей IgG и IgA с клиническими и лабораторными показателями при онкопатологии. В частности, установлено, что БАПНА-амидазная и катепсиноподобная активности иммуноглобулинов обоих классов слабо и умеренно положительно коррелируют с пероксидазной активностью сыворотки в группе ЗНО ( $r = 0,304$ ,  $r = 0,285$ ,  $r = 0,339$ ,  $r = 0,355$ ,  $p < 0,05$ ). IgA с активностью катепсина G умеренно положительно коррелируют с каталазной сывороточной активностью и отрицательно – с катепсиноподобной активностью сывороток ( $r = -0,401$  и  $r = -0,293$ , соответственно,  $p < 0,05$ ). Каталазная активность ИГ класса G умеренно отрицательно коррелирует с показателями СОЭ ( $r = -0,300$ ,  $p < 0,05$ ).

ДНКазная активность IgG положительно коррелирует со стадией заболевания, размером первичной опухоли и ее гистологической структурой ( $r = 0,332$ ,  $r = 0,407$ ,  $r = 0,305$ ,  $p < 0,05$ ), а также умеренно отрицательно с различными видами протеолитической активности. ДНКазная активность IgG умеренно отрицательно коррелирует с поражением регионарных лимфатических узлов ( $r = -0,329$ ,  $p < 0,05$ ).

Также было проведено сравнение уровней абзимной активности для иммуноглобулинов обоих классов. Выяснилось, что удельная каталитическая активность сывороточных IgA в несколько раз превышает соответствующую активность абзимных IgG ( $p < 0,001$  для всех сравниваемых групп).

#### 5. Определение нейтрофильных внеклеточных ловушек в культурах лейкоцитов и в опухолевой ткани методами микроскопии светлого поля

До настоящего времени основным способом определения нейтрофильных внеклеточных ловушек остается люминесцентная микроскопия с окрашиванием НВЛ флюорохромом, специфичным к ДНК ловушек (этидия бромид, Hoechst, акридиновый оранжевый и мн. др. [17]). Однако необходимость применения люминесцентного микроскопа ограничивает широкое внедрение метода в практику клинических лабораторий. В данной работе мы использовали разработанные нами способы выявления НВЛ, основанные на световой микроскопии, с окрашиванием препаратов красителями, специфичными к ДНК ловушек и к ферментам гранулоцитов.

Для определения НВЛ в активированных культурах гранулоцитов материалом для исследования послужила венозная кровь, которую забирали у пациенток в количестве 5-6 мл в пластиковые пробирки с гепарином в расчете 10-15 Ед на 1 мл крови. Кровь отстаивали при 37°C в течение 30 минут под углом 45°, затем в вертикальном положении 15 минут при комнатной температуре. Выделение культур гранулоцитов на градиенте плотности «фиколл-верографин»

выполняли согласно ранее разработанной методике [17].

Окрашивание мазков с НВЛ проводили 5% раствором метилового зеленого – красителя, специфичного для ДНК. Экспозиция мазков с красителем составляла 5 мин. Мазки отмывали дистиллированной водой и высушивали. Результаты оценивали с помощью светового микроскопа Leica DM2000 с использованием объектива 63/1,25; окуляра 10/22, оснащенного камерой Leica DFC295. Подсчитывали 100 морфологических единиц (ловушки, гранулоциты) и определяли процентное содержание НВЛ. Ядра нейтрофилов, нейтрофильные внеклеточные ловушки, представленные тонкими нитями, занимающими пространство, в 2-3 раза превосходящее диаметр неизменного нейтрофила, окрашивались в зеленый цвет (см. Рис.1). Цитоплазма гранулоцитов не окрашивалась. Также обнаруживались нейтрофилы с десегментированными ядрами, окрашенными в зеленый цвет (начальный этап ловушкообразования)

В ряде случаев однокомпонентного окрашивания препаратов для оценки НВЛ недостаточно, так как возникает необходимость подтвердить нейтрофильное происхождение выделенной из клеток ДНК. В частности, такая ситуация возникает при определении НВЛ в мазках-отпечатках или биоптатах из тканей опухолей.

Для решения данной задачи был разработан способ двойного окрашивания НВЛ при помощи метилового зеленого (краситель на ДНК) и субстратного красителя 3,3'-диаминобензидина (ДАБ). ДАБ окисляется миелопероксидазой нейтрофилов в присутствии пероксида водорода с образованием продукта коричневого цвета, хорошо различимого при световой микроскопии.

Рабочий раствор ДАБ готовили на 0,05 М цитрат-аммония ацетатном буфере, pH 5,5 (ЦААБ), так как он дает низкое фоновое окрашивание эритроцитов (совпадает с данными литературы [24]). Раствор готовится *ex tempore* перед каждой серией мазков.

Окрашивание мазков производилось следующим образом: на слайд наносили рабочий раствор ДАБ (содержит 0,01% ДАБ и 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) на 2-3 минуты, промывали дистиллированной водой, докрашивали метиловым зеленым 5 минут. Препарат промывали дистиллированной водой, высушивали на воздухе.

Слайды микроскопировали, как описано выше. Подсчитывали до 200 различных морфологических структур в препаратах, среди них – все ядросодержащие клетки; далее отдельно – нейтрофильные гранулоциты; области, занятые внеклеточной ДНК; нейтрофильные внеклеточные ловушки (двойное окрашивание).

Данный вариант определения НВЛ имеет ряд преимуществ – он позволяет дифференцировать нейтрофилы в массиве тканей при окраске мазков-отпечатков и тем самым подтвердить принадлежность ловушкоподобных структур нейтрофилам.

#### 6. Активность НВЛ у пациенток с новообразованиями молочных желез

Способность к образованию внеклеточных ловушек нейтрофилами оценивали после активации гранулоцитов 7,5 мкМ форбол 12-миристант 13-ацетатом (ФМА) в течение 180 минут. Окраску производили метиловым зеленым. В мазке подсчитывали количество НВЛ, сегментированных и десегментированных нейтрофилов. Определяли процентное содержание НВЛ на 100 структур.

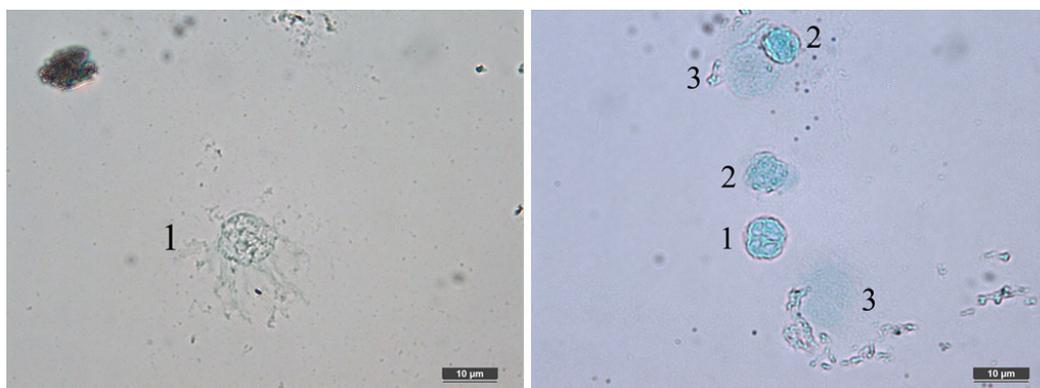


Рис. 1 Морфологические единицы в мазке нейтрофилов. Нейтрофилы с сегментированным ядром (1), с десегментированным ядром (2), нейтрофильные внеклеточные ловушки (3).

Различий в содержании НВЛ в контрольных культурах (без активации ФМА) мазках между группами ЗНО, ФА и КГ не было обнаружено. В свою очередь, содержание НВЛ в активированных образцах культур лейкоцитов пациенток со злокачественными опухолями молочной железы (66%) оказалось достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем у пациенток с доброкачественными новообразованиями (52%) и у здоровых лиц (60%).

Установлено также, что наличие НВЛ в активированной культуре лейкоцитов от 60% и выше достоверно чаще встречается в группе пациенток с карциномой молочной железы в сравнении с группой больных фиброаденомами ( $p < 0,01$ ). Тем самым способность нейтрофилов к образованию НВЛ может явиться дополнительным лабораторным показателем, характеризующим злокачественные опухоли молочной железы.

Кроме того, нам удалось показать, что с помощью комбинированного окрашивания ловушек гистохимическим методом (ДАБ и  $H_2O_2$  для миелопероксидазы) и метиловым зеленым (клеточная ДНК) удается обнаружить НВЛ непосредственно в мазках-отпечатках карциномы молочной железы. В изученных препаратах ( $n=10$ ) выявлялось от 4 до 16 НВЛ на 200 ядросодержащих клеток.

### Выводы

1. Проведена разработка и модификация методов, позволяющих определять абзимную протеолитическую, ДНКазную и оксидоредуктазную активность сывороточных иммуноглобулинов класса G и A, выделенных из одного образца сыворотки крови.

2. Разработано устройство и на его основе – флуоресцентный метод количественной оценки

содержания ДНК в сыворотке крови, а также метод определения нейтрофильных внеклеточных ловушек в культурах гранулоцитов и в опухолевой ткани при помощи световой микроскопии.

3. Установлено, что в крови пациенток с новообразованиями молочной железы и здоровых лиц регулярно выявляются абзимы классов IgG и IgA с протеолитической, ДНКазной и каталазной активностью. Параметры каталитической активности ИГ переменны и зависят от источника выделения иммуноглобулинов. При этом удельная активность абзимов класса IgA на порядок и более превышает удельную активность каталитических IgG. Для выявленных абзимных реакций характерен широкий интервал рН с возможностью нескольких оптимальных значений.

4. У пациентов с новообразованиями молочной железы обнаружены реципрокные количественные изменения в системе «сывороточная ДНКазная активность ( $\uparrow$ ) – сывороточная ДНК ( $\downarrow$ )», а также выявлены изменения ДНКазной активности IgG и IgA, аналогичные сывороточным. Установлен ряд отличий протеолитической и оксидоредуктазной активности сывороток и абзимов в зависимости от вида опухолевого процесса в молочной железе и его клинико-лабораторных характеристик.

5. Стимулированные лейкоциты периферической крови пациенток с карциномой молочной железы образуют нейтрофильные внеклеточные ловушки с повышенной частотой и интенсивностью в сравнении с лейкоцитами лиц контрольных групп (пациентки с доброкачественными образованиями молочной железы и здоровые лица). Данный показатель может быть взаимосвязан со злокачественным опухолевым ростом в тканях молочной железы.

### Литература

1. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. Br Med J. 1957; Vol. 1, No. 5022: 779–786.
2. Manders P. et al. Vascular endothelial growth factor levels do not predict efficacy of systemic adjuvant treatment as assessed in 1127 breast cancer patients. Int. J. Oncol. 2004; Vol. 25, № 2: 511–517.
3. Dawson S.J., Dawson W.Y. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. The new England journal of medicine 2013; Vol. 368 (13): 1199–1209.
4. Funakoshi A. Clinical studies of serum deoxyribonuclease activity in pancreatic disease. Medicine Journal of Gastroenterology. 2008; Vol. 14, № 5: 436–440.
5. Vodounon C. et al. Role of autoantibody in the pathogenesis of patients with atopic bronchial asthma. Research Journal of Immunology. 2015; Vol. 8, №1: 1–16.
6. Волкова М.В. Нуклеазная активность поликлональных иммуноглобулинов класса G у пациентов с ранним ревматоидным артритом. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2012; №1: 12–18.
7. Калинина Е.В. и др. Каталитические аутоантитела при аутоиммунном миокардите: клиническая и патогенетическая значимость. Терапевтический архив 2005; Т. 77, № 9: 65–70.
8. Гальвита А. В. и др. Особенности гидролиза ДНК антителами из крови пациентов с сахарным диабетом. Российский иммунологический журнал 2007; Т. 1(10), № 2: 116–131.
9. Жильцов И.В. и др. Ферментативная активность препаратов IgG при вирусных гепатитах. Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. 1998; Т. 4: 73–77.

10. Моисеева А.М. и др. Каталитическая активность иммуноглобулинов класса G у больных острыми кишечными инфекциями. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2007; № 4: 63–69.
11. Matsuura K. et al. Pathogenicity of catalytic antibodies: catalytic activity of Bence Jones proteins from myeloma patients with renal impairment can elicit cytotoxic effects. *Biol Chem.* 2006; Vol. 387: 543–548.
12. Генералов И.И. Комплексная оценка абзимной активности поликлональных IgG при аутоиммунных, вирусных и онкологических заболеваниях. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2000; №3: 19–24.
13. Berger-Achituv S. et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Frontiers in immunology.* – 2013. – Vol.4. – P. 48.
14. Cools-Lartigue J. et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest.* 2013; Vol. 123(8): 3446–3458.
15. Fujii Y. et al. In vivo antitumor effect of lymphokine-activated rodent polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res.* 1987; Vol. 47: 6000–6005.
16. Kundzer A.V. et al. Deoxyribonuclease activity of polyclonal IgGs: a putative serological marker in patients with spondyloarthritides. *Immunol. Res.* 2013; Vol. 56, Issue 2-3: 457–464.
17. Дядичкина О.В. и др. Модифицированный метод определения нейтрофильных внеклеточных ловушек для оценки состояния врожденного иммунитета : инструкция по применению : утв. 18.06.2015 г. № 029-0515. Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет. Витебск, 2015, 7 с.
18. Генералов И.И. и др. Методы определения и виды каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов класса А. Иммунопатол., аллергол., инфектол. 2015; № 1: 6–17.
19. Шишкин С.С. Использование связывания красителей для количественного определения содержания белка в растворах (обзор). *Вопр. мед. хим.* 1982; №5: 134–141.
20. B. Dewez et al. Serum Alkaline Deoxyribonuclease Activity, a Sensitive Marker for the Therapeutic Monitoring of Cancer Patients: Methodological Aspects. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1993; Vol. 31, No. 11.
21. Генералов И.И. и др. Методы определения и виды каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов класса А. Иммунопатол., аллергол., инфектол. 2015; № 1: 6–17.
22. Генералов И.И., Коротина О.Л., Генералова А.Г., Жерулик С.В. Патент ВУ №10772 У 2015.08.30 МПК G01N 21/64 (2006.01); заявитель Витебск. гос. мед. ун-т. - № и 20150057; заявл. 2015.02.16; зарег. 2015.01.06. Дзярж. рэестр. карысн. мадэляу.
23. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии. *Биохимия* 2000; Том 65, № 11: 1245–1255.
24. Linda L. Vacca, A comparison of methods using diaminobenzidine (DAB) to localize peroxidases in erythrocytes, neutrophils, and peroxidase-antiperoxidase complex. *Stain Technology* 1982; Vol. 53, № 6: 331–336.

#### Сведения об авторах:

Жерулик Софья Валерьевна – аспирант кафедры онкологии с курсом лучевой диагностики и курсом ФПК и ПК ВГМУ; 210603, г.Витебск, ул. Бровка, 33, polozkaya@tut.by, 8-0212-57-64-16.

Луд Николай Григорьевич – зав. кафедрой онкологии с курсом лучевой диагностики и курсом ФПК и ПК ВГМУ, д-р. мед. наук, профессор; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, vsmti.oncology@gmail.com; 8-0212-57-64-16.

Генералов Сергей Игоревич – студент 6 курса лечебного факультета ВГМУ; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27; sig752@mail.ru; 8-033-392-66-28.

Орлова Евгения Георгиевна – студентка 4 курса лечебного факультета; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27; Gmenia12@yandex.ru; 8-29-816-18-68.

Генералов Игорь Иванович – зав. кафедрой клинической микробиологии ВГМУ, д-р. мед. наук, профессор; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, g2@tut.by, 8-0212-37-06-12.

Поступила 5.10.2017 г.