

Некомерческое акционерное общество «Медицинский университет Караганды»

УДК: 611.35-006:612.017.11-089

На правах рукописи

МАРАТКЫЗЫ МЕРЕКЕ

**Морфофункциональная характеристика нейтрофильных внеклеточных
ловушек при колоректальном раке**

6D110100 «Медицина»

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные руководители:

Доктор медицинский наук, профессор

Сирота Валентина Брониславовна

Доктор биологических наук, профессор

Муравлёва Лариса Евгеньевна

Научный консультант

MD, PhD, профессор

Циалковская-Рыж Александра Дорота (Польша)

Республика Казахстан

Караганда, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

	НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
	ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
	ВВЕДЕНИЕ	6
	ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	11
1	КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК И СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШКАХ	12
1.1	Эпидемиология колоректального рака в мире и в Республике Казахстан	12
1.2	Современные представления о нейтрофильных внеклеточных ловушках	16
1.3	Механизмы образования и функции нейтрофильных внеклеточных ловушек в онкогенезе	23
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1	Характеристика клинического материала	33
2.2	Клинические методы исследования больных колоректальным раком	36
2.3	Определение внеклеточных нейтрофильных ловушек крови больных колоректальным раком	36
2.4	Определение тканевых внеклеточных нейтрофильных ловушек опухоли у больных колоректальным раком	36
2.5	Методы статистического анализа	37
3	ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙТРОФИЛОВ И НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК КРОВИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ	38
3.1	Клинико-морфологическая характеристика больных колоректальным раком	38
3.2	Характеристика лейкоцитов и нейтрофилов крови у больных колоректальным раком	40
3.3	Характеристика нейтрофильных внеклеточных ловушек крови у больных колоректальным раком	43
4	СПОСОБНОСТЬ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ТКАНЕВЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ	51
4.1	Тканевые нейтрофильные внеклеточные ловушки у больных колоректальным раком с неоадьювантной лучевой терапией	51
4.2	Тканевые нейтрофильные внеклеточные ловушки у больных колоректальным раком без неоадьювантной лучевой терапии	55
4.3	Общая сравнительная характеристика тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных колоректальным раком	59

5	КОРЕЛЯЦИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК КРОВИ И ТКАНИ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ	66
5.1	Отдаленные результаты терапии больных колоректальным раком	66
5.2	Влияние количественной регенерации нейтрофильных внеклеточных ловушек крови на выживаемость больных колоректальным раком	68
5.3	Влияние количественного высвобождения тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек опухоли на выживаемость больных колоректальным раком	73
5.3.1	Выживаемость больных колоректальным раком в зависимости от высвобождения тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек периферии опухоли	73
5.3.2	Выживаемость больных колоректальным раком в зависимости от высвобождения тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек здоровой ткани вокруг опухоли	75
5.3.3	Выживаемость больных колоректальным раком в зависимости от высвобождения тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек центра опухоли	77
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
	Список литературы	85
	Приложения	97

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

Клинический протокол диагностики и лечения. Одобрен Объединенной комиссией по качеству медицинских услуг Министерства здравоохранения Республики Казахстан от «07» марта 2019 года Протокол №57.

ГОСТ 7.32-2001. (Межгосударственный стандарт) Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.9-95 (ИСО 214-76). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

ГОСТ 7.12-93. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В докторской диссертации использованы следующие термины с соответствующими определениями, обозначениями и сокращениями:

HNPCС	hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome
IL-8	Интерлейкин 8
LPS	компонент грамотрицательных бактерий
MPO	миелопероксидаза
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
NE	Эластаза нейтрофилов
PAD4	фермент пептидиларгининдезиминаза
TAN	Tumor-associated neutrophils
АФК	Активные формы кислорода
ВОЗ -	Всемирная организация здравоохранения
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ -	Желудочно-кишечный тракт
ЗН	злокачественное новообразование
KPP -	Колоректальный рак
КТ	Компьютерная томография
ЛТ	Лучевая терапия
ММР	матриксную металлопротеиназу
мтДНК	митохондриальный ДНК
МУК -	Медицинский университет Караганды
НАДФН- оксидазы	клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс
НВЛ	Нейтрофильные внеклеточные ловушки
ННП	Нейтрофилы низкой плотности
ООД -	Областной онкологический диспансер
РК	Республика Казахстан
РПК	Рак прямой кишки
РТК	Рак толстой кишки
ЭРОБ	Электронный регистр онкологических больных

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Колоректальный рак (КРР) считается исключительно частой патологией: индивидуальный риск развития данного заболевания достигает 5–6%. Ежегодно в мире регистрируется около 1200 000 новых случаев заболевания раком толстой кишки и 700 000 случаев смерти от него [1, 2].

В мире, в целом, заболеваемость неодинакова: самые высокие показатели заболеваемости в Австралии и Новой Зеландии, Европе и Северной Америке, а самые низкие - в Африке и Центральной и Южной Азии [1, 2].

В России колоректальный рак занимает одну из ведущих позиций. Среди мужчин, заболевших злокачественными новообразованиями, КРР находится на 3-м месте после рака легкого и желудка, а у женщин, соответственно, после рака молочной железы и рака кожи [3].

В Республике Казахстан (РК) за 2020 год заболеваемость злокачественными новообразованиями (ЗН) составила 157,3 на 100 тыс. населения. В абсолютных цифрах выявлено 29 701 новых заболевших. В структуре онкологической заболеваемости рак ободочной кишки занимает 6 позицию, составляя 5,5% (2019 год – 5,3%), по сравнению с 2019 году идет повышение заболеваемости. Рак прямой кишки в структуре ЗН обоих полов по рангу занимает 7-е место с удельным весом 5% (2019 год – 5%). От злокачественных новообразований по данным официальной статистики в Казахстане в 2020 году умерло 14 753 человек или 78,66 на 100 000 населения. Рак ободочной кишки в структуре причин смерти населения обоих полов от ЗН в 2020 году, сохранил 5 место, с долей 5,4% в структуре причин смерти. Рак прямой кишки в структуре причин смерти населения обоих полов от ЗН в 2020 году занимает на 6 место с удельным весом 5,22% [4]. По исследованиям Жунусова Г.С., Кузекеева М.А., заболеваемость колоректального рака у русских в РК в целом превышала данные, полученные у казахов, почти в 3,0-3,5 раза [5]. Вероятно, степень факторов риска - особенностей диеты, вредных привычек, социальные условия, этнические и эпидемиологические различия оказывают свое влияние на генез колоректального рака.

Важной особенностью злокачественных новообразований является их относительно автономный рост, регулируемый локально продуцируемыми факторами, к которым относят «факторы микроокружения» опухолей, продуцируемые как самими опухолевыми клетками, так и клетками окружающей их стромы. Постоянным компонентом в структуре микроокружения опухолей являются нейтрофильные гранулоциты. Но их роль в онкогенезе установлена не до конца. Появились данные о том, что помимо противоопухолевой активности нейтрофилы могут демонстрировать и проопухолевую активность, провоцируя метастазирование [6, 7]. В ответ на микробные и немикробные стимулы нейтрофилы активно формируют во внеклеточном пространстве сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ). Волокнистые структуры НВЛ представляют собой основную цепь ДНК,

содержащую гистоны и белки нейтрофилов. Основная функция защитная – уничтожение патогенов [6, 7].

Появились исследования о роли НВЛ при онкопатологии. Так, И.И. Долгушин и соавт. [8] показали диффузные скопления внеклеточной ДНК рядом с опухолевыми клетками карциномы молочной железы, что, по мнению авторов, свидетельствует о появлении НВЛ во внеклеточном микроокружении опухоли. Рост числа НВЛ в крови в ответ на стимул зафиксирован у больных с послеоперационными осложнениями колоректального рака, что позволяет рассматривать НВЛ как потенциальную мишень для терапии [9]. Следует признать, что в настоящее время существует явный дефицит фактических данных об образовании НВЛ при различных видах рака, стадии, локализации и режимов лечения, а имеющиеся результаты достаточно противоречивы.

Представления о роли НВЛ при онкологии сильно варьируют. С одной стороны, есть данные об антиканцерогенных свойствах НВЛ, связанных с прямым разрушением опухолевых клеток и стимуляцией иммунной системы. Цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам проявляют компоненты НВЛ (миелопероксидаза, протеиназы и гистоны), тогда как нити ДНК рассматриваются как своего рода каркас (scaffold) для захвата опухолевых клеток и ограничению их дальнейшего распространения [10]. С другой стороны, сетевидные структуры ловушек могут способствовать миграции и иммунному избеганию опухолевых клеток или созданию физического барьера между опухолевыми клетками и иммунокомпетентными клетками [11]. Высказано предположение о возможной роли НВЛ как прогностического биомаркера течения неопластического процесса [12].

Эффект НВЛ детерминирован местом их образования, их количеством и функциональной активностью. С одной стороны НВЛ в микроокружении опухоли могут обладать пермиссивным эффектом, проявляя антиопухолевую активность. С другой стороны, нейтрофилы в крови онкобольных могут циркулировать в праймированном состоянии. Имеются данные о том, что в крови больных раком желудка обнаружены факторы, повышающие способность нейтрофилов крови здоровых доноров генерировать НВЛ [13]. Образование НВЛ в сосудистом русле повышает риск опухоль-ассоциированного тромбоза, что также следует рассматривать как самостоятельный негативный патогенетический фактор [14].

Рабочая гипотеза

Внеклеточные нейтрофильные ловушки в крови, а так же в центре и периферии опухолевой ткани при колоректальном раке могут демонстрировать как противоопухолевую, так и проопухолевую активности.

Освобождение внеклеточных нейтрофильных ловушек в крови, а так же в центре и периферии опухолевой ткани при колоректальном раке могут зависеть от клинической стадии и оказывать влияние на продолжительность жизни.

Цель исследования - Дать морфофункциональную характеристику нейтрофильным внеклеточным ловушкам при колоректальном раке.

Задачи исследования:

1. Определить способность к генерации нейтрофильных внеклеточных ловушек в крови больных колоректальным раком до и после проводимого лечения.

2. Исследовать способность к генерации нейтрофильных внеклеточных ловушек с мазков отпечатков опухоли у больных колоректальным раком после проводимого лечения.

3. Провести оценку корреляционной зависимости образования нейтрофильных внеклеточных ловушек крови и ткани опухоли от степени морфологической дифференцировки опухоли и распространенности опухолевого процесса.

4. Изучить роли НВЛ в крови, а так же в центре и периферии опухолевой ткани в прогнозе и течении колоректального рака, в т.ч. в продолжительности жизни больных колоректальным раком.

Научная новизна

Впервые определены особенности генерации нейтрофильных внеклеточных ловушек периферической крови у больных колоректальным раком до и после специализированного лечения.

Впервые показано, что медианный показатель НВЛ крови у больных колоректальным раком в сравниваемых группах при первой стадии после операции в группе без неоадьювантной лучевой терапии выше, чем в группе с лучевой терапией ($\chi^2=5,6565$, $p=0,0174$). При 2, 3 и 4 стадиях различий медианных показателей НВЛ крови между группами больных колоректальным раком с лучевой терапией и без нее не выявлено.

Впервые определены особенности нейтрофильных внеклеточных ловушек в опухоли из операционного материала у больных с колоректальным раком. Выявлено разнонаправленное высвобождение НВЛ с центра и периферии опухоли, и здоровой ткани толстой кишки, зависящее от вида неоадьювантного лечения и степени распространенности опухолевого процесса (свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 12095 от 22.09.20г. Жумалиева В. А., Маратқызы М., Кабилдина Н. А., Сирота В. Б «Определение внеклеточных нейтрофильных ловушек (ВНЛ) в тканях опухоли при колоректальном раке»).

Впервые определена количественное влияние нейтрофильных внеклеточных ловушек крови на выживаемость больных колоректальным раком до и после специализированного лечения (свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 24947 от 11.04.22 г. Маратқызы М., Жумалиева В. А., Бейсенаева А.Р. «Влияние количественной регенерации нейтрофильных внеклеточных ловушек крови на выживаемость больных колоректальным раком»).

Впервые определена количественное влияние тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек на выживаемость больных колоректальным раком (свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 24948 от 11.04.22 г. Маратқызы М., Жумалиева В. А., Бейсенаева А.Р. «Влияние количественного высвобождения

тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек опухоли на выживаемость больных колоректальным раком»).

Теоретическая значимость исследования. Полученные результаты позволили сформулировать выводы о механизмах изменения содержания НВЛ крови и опухолевой ткани при колоректальном раке.

Результаты исследования позволяют расширить представление о роли клеточного компонента микроокружения опухоли в прогнозе и течении колоректального рака.

Практическая ценность. Результаты исследования позволили расширить представление о роли НВЛ крови, опухоли и здоровой ткани вокруг опухоли в прогнозе и течении колоректального рака.

Выявлено статистически значимое количественное влияние тканевых НВЛ периферии опухоли на выживаемость больных колоректальным раком. Чем большее количество НВЛ в опухоли, тем выше продолжительность жизни. Если во время операции определяется низкое количество НВЛ в мазках в центре и периферии опухоли, это повод лечащему врачу подумать о дальнейшем продолжении лечения в адъювантном режиме, то есть после операционной лучевой терапии или химиотерапии.

Основные положения, выносимые на защиту:

Медианный показатель НВЛ крови у больных колоректальным раком меняется после проведенного хирургического лечения, которое способствует его повышению. Проведение неоадъювантной лучевой терапии подавляет высвобождение НВЛ крови после операции.

Высвобождение тканевых НВЛ в центре, периферии опухоли и окружающей здоровой ткани при колоректальном раке неодинаковое, зависит от проведения неоадъювантной лучевой терапии.

Образование нейтрофильных внеклеточных ловушек крови в группе больных колоректальным раком с неоадъювантной лучевой терапией имеют прямую корреляцию по Спирмену со степенью морфологической дифференцировки опухоли. Генерация НВЛ центра опухоли у всех пациентов имеет зависимость прямого вида по Пирсону с НВЛ периферии опухоли и НВЛ здоровой ткани. НВЛ здоровой ткани прямо коррелируют со степенью морфологической дифференцировки рака. Количественное высвобождение НВЛ крови и ткани опухоли оказывают прямое влияние на продолжительность жизни больных колоректальным раком.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на:

- Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Современные направления развития клинической и радиационной онкологии. Мультидисциплинарные подходы», 22.05.2019, НАО «Медицинский университет Семей;

- Modern Molecular- biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine -2019” during 07 – 09 November 2019 which will be held in Prague, the Czech Republic;

- на заседании кафедры онкологии и лучевой диагностики НАО МУК, протокола №8 от 21.04.2022

Публикации. По теме исследования опубликованы 17 печатных работ: в материалах международных конференций - 5, в материалах зарубежных конференции – 1, в научных изданиях, рекомендуемых Комитетом – 4 (журнал «Медицина и экология» - 3, Клиническая медицина Казахстана – 1), изданиях рекомендованных РИНЦ (Международный студенческий научный вестник) – 1, в международном научном издании, входящем в базу данных компании Scopus (журнал «Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences», «International Journal of Inflammation», «Contemporary Oncology») – 3. Получено 3 Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 12095 от «22» сентября 2020 года (Определение внеклеточных нейтрофильных ловушек (ВНЛ) в тканях опухоли при колоректальном раке), № 24948 от «11» апреля 2022 года (Влияние количественного высвобождения тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек опухоли на выживаемость больных колоректальным раком), № 24947 от «11» апреля 2022 года (Влияние количественной регенерации нейтрофильных внеклеточных ловушек крови на выживаемость больных колоректальным раком).

Личный вклад автора. Диссертантом самостоятельно выполнялся отбор больных, бралось информированное согласие на исследования, а так же под контролем д.м.н., профессора Сирота В.Б. изготовлялись мазки-отпечатки по методу «Определение внеклеточных нейтрофильных ловушек (ВНЛ) в тканях опухоли при колоректальном раке» (Жумалиева В. А., Мараткызы М. , Кабилдина Н. А., Сирота В. Б., 2020г.) с рассеченной по центру, периферии опухоли и здоровой ткани в послеоперационном материале на предметных стеклах. Совместно с сотрудниками кафедры биомедицины НАО МУК под контролем д.б.н., профессора Муравлёвой Л.Е. проводила окрашивание и подсчет количества внеклеточных сетей ДНК. После подсчета ВНЛ стеклопрепараты фотографировались диссертантом. А так же диссертантом полученные данные были обработаны, проанализированы, результаты оформлены в виде публикаций и научных докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 101 страницах, состоит из перечня обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, список использованных литератур, приложения. Список литературы включает 158 источников на русском и английском языках. Диссертационная работа иллюстрирована 24 таблицами, 35 рисунками.

Реализация работы.

Результаты исследования внедрены в КГП «Областной онкологический диспансер» г. Караганды, получено 2 акта внедрения (приложения В); а так же в учебный процесс кафедры онкологии с лучевой диагностикой и биохимии НАО «Медицинский Университет Караганды». Диссертационная работа написана в рамках научно- исследовательской программы проектно-целевого

финансирования № BR05236771 «Персонифицированный подход в управлении ряда значимых заболеваний». Данный научный проект был одобрен Национальным Научным Советом МЗ РК (03.02.2018) в рамках Конкурса на программно-целевое финансирование по научным, научно-техническим программам на 2018-2020 годы. Реализация данного проекта согласно п.3.10 Договора о совместной деятельности № 121 от 01.09.2017, заключенного между КГП «ООД» г. Караганды и РГП ПХВ «КГМУ» МЗ РК.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК И СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШКАХ

1.1 Эпидемиология колоректального рака в мире и в РК

На сегодняшний день имеет место неуклонный рост заболеваемости злокачественными новообразованиями во всех странах мира [1, 2, 15]. Колоректальный рак (КРР) считается наиболее грозной патологией среди злокачественных опухолей, включающей следующие нозологические единицы: рак толстой кишки (РТК), рак прямой кишки (РПК) и рак анального канала (РАК) [2, 16]. КРР имеет наиболее четкие признаки клеточного перехода слизистой в рак, обусловленного этиопатогенетическими факторами [17, 18]

Ежегодно в мире регистрируется более 1 миллиона больных раком толстой кишки и около 500 тыс. смертей от этого заболевания. Существует выраженная географическая и этническая вариабельность в распространении КРР в различных странах мира. Так, в государствах Юго-Восточной Азии рак ободочной и прямой кишки выявляется в 10-20 раз реже, чем в странах Европы, Соединенных Штатах Америки (США), Японии [19, 20].

Рак ободочной и прямой кишки является одной из распространенных злокачественных опухолей в мире, заболеваемость растет как в развитых, так и развивающихся странах [19, 20]. Заболеваемость КРР и смертность от него по миру имеют значительные различия. Статистические данные GLOBOCAN показывают, что в 2018 г. число случаев этой патологии в мире составило 1849518, при этом больных РТК было 1096601 (59,3 %), больных РПК – 704376 (38,1 %), больных РАК – 48541 (2,6 %)[19, 20].

А так же данные GLOBOCAN за 2018 год, рак толстой кишки занимает четвертое место в мире по распространенности рака, а рак прямой кишки - восьмое место по частоте встречаемости [19]. Вместе КРР являются третьей наиболее часто диагностируемой формой рака в мире, составляя 11% от всех диагнозов рака.

Наиболее часто КРР встречается в Северной Америке, Австралии, Новой Зеландии и в некоторых странах Европы, а самые низкие показатели заболеваемости – в Африке и Центральной и Южной Азии. По данным Американского института исследований рака колоректальный рак является третьим по частоте диагностированием рака у мужчин и вторым по количеству КРР у женщин во всем мире. Показатели заболеваемости в мире КРР сегодня достигают 85 - 90 на 100 тыс. населения, возрастая с 24,9 – в возрастной группе до 50 лет до 249,7 – среди пациентов старше 60 лет [19, 20, 21]. Стандартизированный по возрасту (мировой) уровень заболеваемости на 100тыс.населения КРР у обоих полов составляет 19,7, у мужчин - 23,6, а у женщин - 16,3 [20].

В последние годы на фоне относительно стабильной заболеваемости колоректальным раком исследователи отмечают увеличение частоты встречаемости его у молодых пациентов, моложе 50 лет. При проведении ретроспективного исследования за 2003-2016 гг. в США выявлен рост заболеваемости у молодых людей в 1,5 выше по сравнению со средне национальными показателями [19, 20].

Заболеваемость КРР зависит от этнической принадлежности пациента. Согласно данным Национального реестра онкологических заболеваний Израиля, уровень распространенности КРР среди арабов ниже, чем среди еврейского населения во всех возрастных группах. На основании данных за 2012 г. стандартизированный по возрасту показатель (на 100 000 случаев) рака ободочной кишки среди арабских мужчин и женщин составлял 18,99 и 15,6 по сравнению с 22,89 и 17,74 в еврейской популяции. Соответствующие показатели для рака прямой кишки составляли 7,06 и 6,93 среди арабского населения и 10,66 и 7,31 среди еврейского населения [22].

Andreana Holowatyj et al. исследовали провели очень интересную работу по различию в клинико-патологических и расовых/этнических характеристиках среди подростков и молодых людей, у которых диагностирован колоректальный рак в Соединенных Штатах [23]. Были использованы данные программы Национального института рака, эпиднадзора, эпидемиологии и конечных результатов и определены лица, у которых был диагностирован первичный колоректальный рак в возрасте от 15 до 39 лет с 2010 по 2015 год. Следует отметить, что 28,6% случаев у молодых людей были диагностированы правосторонние опухоли (слепая кишка поперечной ободочной кишки). Различия в клинической стадии наблюдались в возрастных группах, причем заболевание II стадии возрастало с возрастом. Доля испаноязычных была выше у более молодых пациентов, составляя 21,0% населения в возрасте 35–39 лет и 28,3% лиц в возрасте 15–19 лет [23].

Заболеваемость КРР в США на 25% выше у мужчин, чем у женщин, и почти на 20% выше у афроамериканцев, чем у белого населения [24, 25].

Странами с самыми высокими стандартизированными показателями заболеваемости являются: Республика Корея (45 на 100 000), Израиль (35,9 на 100 000), Сингапур (33,7 на 100 000) Япония (32,2 на 100 000) и Иордания (25,6 на 100 000) [26].

Другие опубликованные данные показывают, что тенденция не одинакова во всех географических регионах, особенно при рассмотрении восточных стран. Хотя самые высокие показатели заболеваемости колоректальным раком все еще можно обнаружить в Северной Америке, Европе и Австралии/Новой Зеландии, в других странах, например, в Японии и Таиланде, а так же в Иране тоже наблюдается быстрый рост заболеваемости колоректальным раком [27, 28]. За последние десять лет показатель в Саудовской Аравии увеличился более чем в два раза [29].

Рак ободочной и прямой кишки в России регистрируется отдельно и занимает одну из основных позиций. В России по данным 2015 г.

зарегистрировано выше 68 тыс. случаев КРР. В общей панели злокачественных опухолей в России КРР составляет 11,5%. Среди мужчин данный показатель составляет 11,4%, занимая третье место после рака легкого (17,8%), предстательной железы (14,4%). В том числе у лиц женского пола КРР достигает 11,7% и занимает третью позицию после рака молочной железы (20,9%) и кожи (14,6%) [3, 30]. По данным на 2020 год, в России рак толстой кишки выявляется у 25-30 тысяч пациентов в год. В России треть случаев рака кишечника определяется посмертно [3].

Используя данные Национального центра статистики здравоохранения в своем исследовании коллеги в США изучили показатели смертности от КРР в период с 1970 по 2011 г. для всех округов США. Они выявили, что стандартизированный по возрасту уровень смертности от КРР снизился с 29,2% на 100 000 американцев в 1970 г. до 15,1% на 100000 в 2011 г. До 1990 г. показатели смертности от КРР были самыми высокими на северо-востоке и в центральной части США и самыми низкими на юге. Однако к 2000-м годам показатели в целом были однородными по всей стране, за исключением некоторых отдельных пространственных кластеров или горячих точек [31].

С самыми высокими стандартизованными показателями смертности от колоректального рака являются такие 5 стран: Иордания (15,5 на 100 000), Казахстан (12,8 на 100 000), Корейская Народно-Демократическая Республика (12 на 100 000), Бруней (12 на 100 000) и Япония (11,9 на 100 000) [26].

Наследственный КРР составляет 7-10% всех случаев и включают наследственный неполипозный колоректальный рак (синдром Линча), а также синдромы аденоматозного и гамартоматозного полипоза [32]. До 30% пациентов с КРР имеют семейный анамнез новообразования, что означает, что, вероятно, существуют предрасполагающие мутации зародышевой линии, еще не выявленные исследователями. Те, у кого есть родственник первой степени родства с этим заболеванием, подвержены риску в 2–4 раза выше [32].

Наиболее распространенным наследственным синдромом является HNPCC, в настоящее время известный как синдром Линча, на который приходится 2–4% всех случаев. Синдром Линча представляет собой доминирующий образец наследственности при КРР. У людей с этим заболеванием вероятность развития КРР к 50 годам составляет около 20%, а к 70 годам - около 50% (мужчины представляют более высокий риск, чем женщины). Синдром Линча также увеличивает риск развития рака пищевода, эндометрия, тонкой кишки, яичников и желудка [33].

Заболеваемость колоректальным раком увеличивается с возрастом, около 40% случаев диагностируются после 75 лет. Около 40% пациентов имеют диагноз I-II стадии, 40% - III стадии и 20% - IV стадии [34]

Однако несмотря на рост заболеваемости улучшения в лечении КРР привели к снижению смертности во второй и третьей категориях стран. Движущей силой большей выживаемости было удаление полипов и другие усилия по раннему выявлению, такие как колоноскопия, щадящая сигмоидоскопия, колонография с помощью компьютерной томографии (КТ),

иммунохимия фекалий и анализ скрытой крови в фекалиях [35]. Внедрение более качественных скрининговых тестов могло первоначально повысить уровень заболеваемости из-за диагноза ранее недиагностированного заболевания, но в долгосрочной перспективе снизило смертность благодаря удалению предраковых полипов [36].

5-летняя относительная выживаемость при раке толстой кишки I стадии в США составляет около 92%. Показатель для стадии IIА и стадии IIВ составляет 87% и 65%. Удивительно, но 5-летняя выживаемость при стадиях IIIА и IIIВ несколько выше - 90% и 72%. Стадия IIС имеет выживаемость 53%, тогда как стадия IV или метастатический КРР имеет 5-летнюю выживаемость только 12% [37].

5-летняя выживаемость при раке прямой кишки в основном немного ниже: 88% для стадии I, 81% для стадии IIА, 50% для стадии IIВ, 83% для стадии IIIА, 72% для стадии IIIВ, 58% для стадии IIС. и 13% для IV стадии [37].

Заболеваемость КРР сильно различается по регионам и может достигать восьмикратных различий между странами. В странах, переживающих серьезный переходный период в развитии, показатели заболеваемости имеют тенденцию к равномерному росту с увеличением индекса человеческого развития, что указывает на причинно-следственную связь [19].

В Республике Казахстан в структуре злокачественных новообразований в 2019 г. рак ободочной кишки и рак прямой кишки занимал 5, 6 места после рака молочной железы, легкого, желудка и шейки матки [4, 38]. В 2020 году в структуре заболевших по 10-ти основным локализациям злокачественных новообразований, которые составили 67,2% (2019 год – 66,6%), расположение по рангам (оба пола) стабильное по 3-м первым позициям, на 4 позицию с 7-ой в 2020 году поднялись ЗН лимфатических и кроветворных тканей, соответственно последующие локализации (рак шейки матки, ободочной кишки, прямой кишки) опустились на одну позицию в той же последовательности.

Рак ободочной кишки в структуре онкопатологии обоих полов населения опустился на 6-е место, составляя 5,5% (2019 год – 5,3%). Уровень заболеваемости раком данной локализации по стране 2020 году снизился до 8,7‰ (9,2‰) [4, 38].

Рак прямой кишки в структуре ЗН за 2020 год обоих полов по рангу спустился с 6-го на 7-е место с удельным весом 5% (2019 год – 5%), у мужчин – с 4-го на 6-е, у женщин – стабильно на 9-м. Показатель заболеваемости снизился и составил 7,8‰ (2019 год – 8,7‰) [4, 38].

Удельный вес I-II стадий злокачественных новообразований по основным локализациям в 2020 году составил 57,6%. Больные с ЗН ободочной кишки I-II стадий составил 53,1%, рак прямой кишки 68,5% выявлен в начальных стадиях. Несмотря на рост показателей заболеваемости данной патологии, постадийное распределение свидетельствует о преимущественном преобладании I-II стадий рака прямой кишки с 2011 года, когда был впервые внедрён скрининг КРР.

Уровень одногодичной летальности у больных со ЗН составил ободочной кишки – 19,8% (18,7%), прямой кишки – 18,8% (19,4%) [4, 38].

По республике за 2020 год показатель поздней диагностики рака (IV стадия) по сумме всех нозологий возрос с 11,9 (2019г) до 13,1%, из них рак ободочной кишки 17,3%, рак прямой кишки 13,2% выявлен в запущенной форме [4, 38].

Рак ободочной кишки в структуре причин смерти населения обоих полов от ЗН в 2020 году, как и в 2019 году, сохранил 5 место, с долей 5,4% в структуре причин смерти (2019 год – 5,2%). При этом показатель смертности возрос с 3,9 до 4,1 ‰ [4, 39].

Рак прямой кишки в структуре причин смерти населения обоих полов от ЗН в 2020 году поднялся с 8 на 6 место с удельным весом 5,22% (2019 год – 4,7%). В целом по республике показатель смертности от этой локализации рака составил 3,9 ‰ (2019 год 3,6 ‰) [4, 39].

Результаты данного обзора доказывают что это болезнь современности и самые высокие показатели заболеваемости в развитых странах. По мере того, как мир становится богаче и все больше людей переходят на западную диету и образ жизни, заболеваемость КРР, вероятно, будет увеличиваться. Как и при многих других новообразованиях, ученые обнаруживают, что большую роль играют микроокружение опухоли. Но до сих пор остается загадкой, влияние микроокружения опухоли на течение заболевания и прогноз. Это лишь один из нескольких фундаментальных вопросов о заболевании, которые еще предстоит решить.

В настоящее время большое внимание уделяется персонализации назначаемого лечения. Необходимость индивидуализации связана с потребностью в совершенствовании методов диагностики и своевременного лечения больных, что должно привести к увеличению пятилетней и сроков безрецидивной выживаемости. Несмотря на совершенствование хирургической техники и химиотерапии, еще не преодолена болезнь полностью из-за метастазов. Опять-таки, появление более точных дополнительных факторов прогноза могло бы в значительной степени облегчить выбор наиболее целесообразной схемы терапии и усовершенствовать лечение конкретных пациентов с колоректальным раком.

1.2 Современные представления о внеклеточных нейтрофильных ловушках

Нейтрофилы, наиболее распространенный тип иммунных клеток в крови и являются одной из первых линий защиты от многих патогенов. Они широко признаны в качестве важных членов как врожденного и адаптивных реакций иммунных и ответчиков против экзогенных захватчиков, в том числе различных видов бактерий, вирусов и грибов [40-42]. Однако их присутствие может быть воспринято как палка о двух концах, обеспечивающая защиту во многих сценариях, вызывая при этом ущерб или обострение заболеваний у других. С одной стороны, пациенты, у которых отсутствуют нейтрофилы,

страдают от тяжелой иммуносупрессии, часто умирая от бактериальных или грибковых инфекций в молодом возрасте [10]. С другой стороны, чрезмерная или непропорциональная активация нейтрофилов может привести к высвобождению подавляющего количества активных форм кислорода, большого количества провоспалительных цитокинов и других цитотоксических медиаторов, которые могут прямо или косвенно повредить эндотелий и вызвать гибель клеток [43].

Фактически, противоопухолевые свойства нейтрофилов были признаны более трех десятилетий. Нейтрофилы могут напрямую убивать опухолевые клетки как *in vitro* [44], так и *in vivo* [45]. При активации нейтрофилы усиливают этот противоопухолевый эффект. Например, линия клеток аденокарциномы толстой кишки, трансфицированная для экспрессии гранулоцитарный колониестимулирующий фактора (G-CSF) теряла канцерогенную активность после значительной концентрации нейтрофилов в месте опухоли [46].

Нейтрофилы явно обладают потенциалом прямого уничтожения опухолевых клеток. Механизмы, с помощью которых нейтрофилы выполняют эту функцию, многочисленны и до конца не изучены, но они включают многие из тех же антимикробных и иммунорегуляторных функций нейтрофилов [47]. Нейтрофилы производят активные формы кислорода (АФК) и хлорноватистую кислоту (НОСl), которые могут напрямую повреждать и разрушать опухолевые клетки. Нейтрофилы также могут вызывать апоптоз некоторых опухолевых клеток путем прямого контакта или высвобождения TRAIL (цитокин вызывающий апоптоз) [48]. Наиболее эффективным противоопухолевым механизмом является антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC). Молекулы антител которые связываются с опухолевыми антигенами, распознаются рецепторами Fc на нейтрофилах. Это связывание активирует цитотоксический ответ против опухолевой клетки. Нейтрофилы могут быть активированы для проявления более сильного противоопухолевого фенотипа с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), трансформирующего фактора роста- α (TNF- α) или путем блокирования трансформирующего фактора роста- β (TGF- β). Кроме того, блокирование IL-8 специфическими моноклональными антителами (такими как mAb ABX-IL8) может предотвратить инфильтрацию новых нейтрофилов в растущие опухоли. Воспалительные нейтрофилы также могут активировать цитотоксические (CD8) Т-клетки. Все эти механизмы приводят к уменьшению опухолей [46].

В 2004 году открытие удивительного, до сих пор неизвестного защитного механизма нейтрофилов возродило интерес к функциям нейтрофилов и их роли в здоровье и болезнях [6]. Ученые Института инфекционной биологии имени Макса Планка (Берлин, Германия), работающие под руководством Артуро Зыхлински (Arturo Zychlinsky), открыли и расшифровали еще один используемый нейтрофилами механизм уничтожения патогенов [7]. Эта новая функция состоит из высвобождения трехмерных сетей, называемых

внеклеточные нейтрофильные ловушки (НВЛ, Neutrophil Extracellular Traps, NETs) [12, 49].

НВЛ представляют собой внеклеточные нити деконденсированных (размотанных) волокон ДНК в комплексе с гистонами и белками нейтрофильных гранул, включая матриксную металлопротеиназу (ММП), эластазу нейтрофилов (NE), миелопероксидазу (МРО), катепсин G, лактоферрин, желатиназа, лизоцим C, кальпротектин и другие [12, 10, 50, 51]. В первые несколько лет после первоначального отчета в 2004 г. [6] научных исследованиях термин «внеклеточный нейтрофильный ловушки» широко использовался вместо NETs. В 2018 году Комитет по номенклатуре клеточной смерти Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) настоятельно рекомендовал заменить термин «NETosis» на «НВЛ» или «НВЛ-образование», чтобы включить экструзию ДНК в отсутствие гибели клеток [52].

С момента первоначального открытия бактериальной инфекции как стимулирующего фактора для НВЛ, в последнее десятилетие было обнаружено все большее количество стимулов, запускающих образование НВЛ. В дополнении к бактериям, могут быть различными индукторами: микроорганизмы [53 - 55], активированные тромбоциты, комплементарные пептиды, аутоантитела, IL-8, перекисью водорода, кристаллы урата, сигаретный дым [56, 57] LPS (компонент грамотрицательных бактерий) [58, 59]. Примечательно, что механизмы стимуляции образования НВЛ различаются и *in vitro* и в условиях *in vivo*. Например, было продемонстрировано, что LPS эффективен в индукции образования НВЛ *in vitro* посредством прямой стимуляции нейтрофилов. Однако было показано, что LPS может вызывать образование НВЛ только путем связывания активированных тромбоцитов *in vivo* [60]. Из-за сложности условий *in vivo* и относительной ограниченности методов исследования очень мало исследований посвящено специфическим индукторам образования НВЛ *in vivo* [61].

Основываясь на знании биологических и морфологических характеристик НВЛ, было разработано несколько методов обнаружения и мониторинга образования НВЛ, включая иммунофлуоресценцию, иммуногистохимию, прижизненную микроскопию, визуализацию живых клеток, методы умирания с интеркаляцией ДНК и иммуноблоттинг. С помощью этих приемов и методов, ученые узнали что НВЛ активно вовлечен в патогенезе и прогрессировании нескольких видов расстройств, таких как: воспалительные заболевания кишечника [59-61], рассеянный склероз [62-64], атеросклерозе [64, 65], ишемическом инсульте [66] и некоторых других аутоиммунных заболеваниях [67, 68]. Более того, все большее количество исследований раскрывает участие НВЛ в возникновении и развитии злокачественных опухолей, которые будут подробно обсуждаться в следующих разделах.

Хотя точные молекулярные и биохимические механизмы, участвующие в образовании и выпуске НВЛ не до конца изучены, на данный момент описаны три различных пути *NETosis*. Во многих литературных источниках более углубленно характеризуется литический путь гибели клеток [8, 69, 70].

Он является медленным и приводит к гибели клеток в течение 2–3 ч. Вторым путем был описан быстрый механизм (жизненно важный), независимый от лизиса клеток, который требует быстрого (в течение нескольких минут) везикулярного высвобождения ядерного содержимого нейтрофилов. В отличие от первых двух механизмов *NETosis*, которые включают высвобождение ядерной ДНК, третий механизм, не являющийся литическим, включает высвобождение митохондриальной ДНК [71].

Литический *NETosis*, также известный как суицидный *NETosis*, представляет собой активную гибель клеток. Термин *NETosis* был впервые введен Штейнбергом и Гринштейном для описания суицидного *NETosis* [72]. Данный процесс, отличается от некроза или апоптоза [73, 74]. После контакта индуктора с рецепторами на мембране клетки активируется молекулярный каскад, который приводит к выходу кальция из эндоплазматического ретикулума, что в свою очередь вызывает повышение активности цитоплазматического фермента пептидиларгининдезимины (PAD4). Наряду с этим уменьшается конденсация хроматина. Через некоторое время нейтрофилы теряют гетерохроматические области ядра, в результате чего ядра расширяются и становятся круглыми. Ядерная оболочка распадается на везикулы, мембраны гранул и митохондрий разрушаются, что приводит к смешению цитоплазмы, кариоплазмы и антибактериальных пептидов. Белки гранул адсорбируются на отрицательно заряженных фибриллах деконденсированного хроматина, который служит скелетом для ловушки. В конечном итоге клеточная мембрана разрывается и содержимое клетки выбрасывается наружу и разворачивается в пространстве, образуя сеть [75].

Каждая стадия, составляющие литический *NETosis*, идентифицированы.

Хотя нейтрофилы являются транскрипционно активными клетками, большая часть их ДНК транскрипционно неактивна и конденсируется в гетерохроматин внутри ядра. ДНК оборачивается вокруг гистонов, образуя нуклеосомы, а затем организуется в хроматин. Деконденсация гетерохроматина опосредуется PAD4, которая катализирует превращение гистоновых аргининов в цитруллины, уменьшая сильный положительный заряд гистонов и, следовательно, ослабляя связывание гистонов с ДНК [76]. Это ослабленное взаимодействие впоследствии разворачивает нуклеосомы, что является предпосылкой для образования НВЛ. Скачки внутриклеточного Ca^{2+} важны для распространения внутриклеточной передачи сигнала во время физиологической активации нейтрофилов, а PAD4 активируется Ca^{2+} [12, 77].

Последовательные этапы суицидного *NETosis*:

1. Распознавание раздражителей через рецепторы.
2. Активация пути киназ Raf / MEK / ERK и увеличение цитозольного кальция, что приводит к фосфорилированию gp91phox для активации комплекса оксидазы NADPH и последующего образования АФК.
3. Транслокация эластазы и миелопероксидазы в ядро из гранул азурофилов под действием АФК и других, еще неизвестных факторов. Деконденсация хроматина и потеря дольчатой формы ядра.

4. Потеря ядерной и гранулярной мембраны, ассоциация деконденсированного хроматина с цитоплазматическими компонентами.

5. Потеря плазматической мембраны и высвобождение ДНК в виде внеклеточных ловушек.

Представление о том, что существуют альтернативные пути *NETоза*, в дополнение к Пути литического гибели клеток был развит несколькими группами. Одним из таких путей является жизненно важный *NETоз*. ВИТАЛЬНЫЙ *NETОЗ* - это быстрый процесс, посредством чего жизнеспособность и функция клеток сохраняются в контексте контролируемых, инкрементный сброс ядерного материала после облучения нейтрофилов к различным микроорганизмам и их продуктам, и появляется быть обобщенным ответом на различные классы микробных патогенов [78]. В этом случае нейтрофилы стимулируются к высвобождению НВЛ через образование пузырей ядерной оболочки и везикулярный экспорт, сохранение целостности плазматической мембраны. Важно, и также в отличие от литического *NETоза*, требование вовлечения НАДФН-оксидазы при витальном *NETозе* варьирует с увеличением цитозольного кальция, по-видимому, достаточно в случае некоторых раздражителей, таких как бактериальные порообразующие токсины и ионофоры кальция, или альтернативно через АТФ-независимую активацию NFκB21 [78]. В отличие от литического *NETоза*, только 20-25% нейтрофилов подвержены *NETозу* при воздействии. к микробным патогенам или их продуктам *in vitro*. Это наблюдение не только согласуется с существованием субпопуляции нейтрофилов высокоспециализированный для выполнения витального *NETоза*, но также предлагает этот жизненно важный, в отличие от литического, *NETоз* более физиологически релевантным для двух процессов [79, 80].

В 2010 году Pilszczek et al. показали, что высвобождение НВЛ, индуцированное *Staphylococcus aureus*, происходит за счет пузырей ядерной оболочки и везикулярного экспорта *in vitro* и *in vivo* [77]. В результате этот путь сохранил целостность плазматических мембран нейтрофилов. А так же было доказано что нейтрофилы превратившиеся в ядерные цитопласты, способны преследовать и задерживать живых стафилококков [77].

Образование сеток митохондриального происхождения также является одним из жизненно важных *NETоз*. Хотя наличие митохондриальные ДНК-содержащие сети были продемонстрированы *in vitro*, менее известно о его роли в защите хозяина, которая из-за отсутствием гистонов может быть несколько ограничена [81].

Многие другие стимулы, такие как ионофоры кальция, нигерицин, определенные микробы, ультрафиолетовый свет и некоторые кристаллы, приводят к образованию НВЛ без оксида NADPH, но требуют митохондриальных активных форм кислорода [82, 83].

Происхождение из митохондриальной ДНК было обнаружено в 2009 году Yousefi и другими [81]. Как упоминалось выше, АФК незаменимы при некоторых видах *NETоза*. У млекопитающих как митохондриальная

дыхательная цепь, так и НАДФН-оксидаза вносят вклад в производство АФК. Недавно было обнаружено, что ингибирование *in vivo* продукции митохондриальных АФК снижает внутриклеточные уровни АФК и *NEToz* [82]. Иммунные комплексы рибонуклеопротеидов использовали для стимуляции нейтрофилов и генерации митохондриальных АФК. Митохондрии становились гипополяризованными, перемещались на клеточную поверхность и наблюдались внутри вытесненных НВЛ. Одновременно митохондриальные АФК окисляли митохондриальную ДНК (мтДНК). При инъекции мышам окисленная мтДНК запускала воспаление и продукцию интерферона типа I. Подобно бактериям, внеклеточные митохондрии являются стимуляторами провоспалительной передачи сигналов. Некоторые исследования связывают этот эффект с неметилованными повторами ДНК CpG в мтДНК, другие подчеркивают эффект окисления ДНК [83]. Каплан и его коллеги исследуя этиопатогенез системной красной волчанки обнаружили что НВЛ образуется из митохондриальной ДНК, а так же усиливают активность заболевания [84]. Соответственно, авторы не только подтвердили, что митохондрии вызывают *NEToz*, но также пришли к выводу, что *NEToz* является патологическим фактором, способным вызывать системную красную волчанку [85].

Важен баланс между образованием и разрушением нейтрофильных внеклеточных ловушек. Так, нарушение их образования приводит к тяжелым гнойно-септическим процессам. Избыточное образование НВЛ показано при аутоиммунных заболеваниях (ревматоидном артрите, системной красной волчанке) [84, 85], бронхиальной астме [86], респираторном дистресс синдроме [97], преэклампсии [88], тромбозе [89] а так же при злокачественных опухолях [90].

Таким образом, появляется все больше доказательств того, что образование НВЛ может происходить с помощью трех различных механизмов [6, 77, 81, 91]: (1) классическое высвобождение НВЛ посредством лизиса клеток (*NETosis*); (2) высвобождение НВЛ жизнеспособными клетками, опосредованное высвобождением везикулярной ядерной ДНК; и (3) высвобождение НВЛ жизнеспособными клетками, образованными митохондриальной ДНК. Важно отметить, что витальный *NEToz* посредством везикулярного высвобождения ядерной ДНК кажется более быстрым и независимым от окислительного взрыва, но детальные клеточные механизмы, которые приводят к образованию НВЛ жизнеспособными клетками или к высвобождению митохондриальной ДНК, все еще не совсем ясны.

Методы определения НВЛ. Количественная оценка уровня образования НВЛ является многим врачам незнакомым и необычным диагностическим критерием в лабораторноклинической практике. Однако применяющиеся в настоящее время методы для определения НВЛ не позволяют широко использовать их при массовых иммунологических исследованиях, так как требуют применения люминесцентной микроскопии с использованием флуоресцентных высокочувствительных красителей к ДНК [6, 8, 92].

Иммуноцито- и иммуногистохимия - наиболее широко используемые методы обнаружения НВЛ. НВЛ идентифицируются как структуры, содержащие внеклеточную ДНК, совместно локализованную с белками, происходящими из гранул, такими как эластаза нейтрофилов и гистоны [93 - 95]. Образование НВЛ можно отслеживать в реальном времени с помощью прижизненной микроскопии [96], визуализации живых клеток [97] и с помощью методов, основанных на ДНК-интеркалирующих красителях [98, 99]. При правильной подготовке образца и использовании надлежащих контролей, НВЛ могут быть визуализированы в тканевых срезах и в выделениях жидкости [100], хотя демаркация некроза может быть сложной задачей, и следует соблюдать осторожность, чтобы избежать чрезмерную интерпретацию результатов. Подтверждение присутствия белков гранул также рекомендуется в этих условиях и даже в условиях *in vivo* для идентификации НВЛ. Сети могут казаться облачными или нитевидными [101, 102].

Рассматривая, обзор литературы по данному вопросу, было обнаружено доступные протоколы, касающиеся оптимальной плотности клеток для хороших результатов визуализации и количественного определения НВЛ [103]. Для количественной оценки НВЛ в литературе используются два основных параметра: (1) индукция НВЛ, измеренная путем количественной оценки процента выпуска НВЛ или количества НВЛ на поле зрения, и (2) деградация НВЛ, измеренная путем количественной оценки площади НВЛ.

Большая часть клиническо-диагностические лаборатории находящихся в районах, а так же городах не оборудованы люминесцентной микроскопии. Обнаружение НВЛ микроскопией в проходящем свете пока активно не применяется. Всеми известный метод окрашивание по Романовскому-Гимзе не является стандартным на ДНК и выявляет все продукты распада клеток крови независимо от их происхождения. В то время как известно, что краситель метиловый зеленый способен специфически связываться с ДНК и может применяться для количественного определения ДНК и фермента ДНКазы в биологических жидкостях [92].

Brinkmann V. и соавт. использовали сканирующую электронную микроскопию для визуализации образовавшихся структур [6, 7]. Однако этот способ обнаружения нейтрофильных ловушек требует наличия специального оборудования, набора реактивов для приготовления препарата и аккуратного выполнения исследования, так как образующиеся структуры очень хрупкие и быстро разрушаются при механическом воздействии, и потому не может быть использован для экспресс-обнаружения и количественной оценки.

Для определения нейтрофильных ловушек, которые являются по своей сути волокнами ДНК, Долгушин и его коллегами были использованы способ выявления нуклеиновых кислот по способу Фельгена [8, 69, 70]. Однако данная реакция требовала фиксации клеток на стекле по методу Лилли в 10% забуференном формалине, готовые реагенты нуждались в специальных условиях хранения. Постановка реакции проходила в 2 этапа и занимала ~2-2,5 часов. Однако даже при соблюдении всех требований выполнения этой

реакции, учет представлял определенные сложности: при световой микроскопии не всегда удавалось рассмотреть тонкие внеклеточно расположенные волокна ДНК активированных нейтрофилов и, кроме того, не определялись бактерии-активаторы.

Учитывая, что акридиновый оранжевый окрашивает ядра нейтрофилов в зеленый цвет, так же И.И. Долгушиным был использован этот краситель для определения внеклеточно расположенных волокон нейтрофильных ДНК [8, 69, 70]. Такой способ окраски позволил качественно и количественно охарактеризовать это явление, просмотр мазков под люминесцентным микроскопом.

В научных трудах Савочкина А.Ю для определения внеклеточные ДНК-ловушек, образованные нейтрофилами, выделенными из периферической крови, так же использовались методы окраски по Романовскому-Гимзе, акридиновым оранжевым и с помощью Sytox green [104].

В работах Дядичкина О.В и его коллег, Республика Беларусь, были использованы высокочувствительные флуоресцентные красители Sytox Green, DAPI, акридиновый оранжевый и Hoechst 33342. После обработки последними лейкоциты и ДНК ловушки определяли с помощью люминесцентной микроскопии с использованием соответствующих источников излучения и наборов светофильтров. Для световой микроскопии применяли краситель метиловый зеленый. Результаты, полученные при люминесцентной микроскопии с использованием Hoechst 33342 и световой микроскопии с красителем метиловый зеленый, статистически не отличались [88].

Один минус данного метода - стоит не дешево и не все медицинские учреждения имеют возможность использовать.

Таким образом, микроскопия очень специфична, но всегда ограничена тем, что зависит от наблюдателя и требует очень много времени. В последних исследованиях ученые из России [105, 106], а так же из Казахстана мазки с нейтрофильными ловушками начали окрашивать красителями эозин-метиленовый синий по методу Май-Грюнвальду [11, 107, 108]. Метод Май-Грюнвальду широко распространен во всем мире, окрашиваются мазки для просмотра под световым микроскопом, который однозначно имеется во всех лабораториях. Преимущество метода является четкое прокрашивание ядер, вследствие чего хорошо просматриваются структуры хроматина, а также бактериальная флора и простейшие. Во всех выше указанных методах подсчет ведется 100 структур разных групп и определяя процентное содержание каждой морфологической единицы.

1.3 Механизмы образования и функции внеклеточных нейтрофильных ловушек в онкогенезе

Сначала эти сети описывались как средство захвата и уничтожения бактерий и грибов. В последнее время дисрегулируемая активация нейтрофилов с чрезмерным продуцированием НВЛ отрицательно сказывалась на многих заболеваниях, в том числе некоторых со значительной

заболеваемостью и социально-экономическими последствиями, такими как тромбоз, нарушение заживления ран, преэклампсия, хронические воспалительные заболевания и ишемия-реперфузия после инфаркт миокарда. Кроме того, исследования роли НВЛ в прогрессировании рака и метастазировании в настоящее время развиваются как новая «горячая» тема.

Во всем мире рак является ведущей причиной смертности [1, 18, 19]. Несмотря на достижения в области онкологии, сфокусированные на диагностике и прогнозе, метастазирование является одной из основных причин смерти от рака, и его профилактика остается серьезной клинической проблемой.

Роль, которую играют НВЛ в прогрессировании опухоли, только начали охарактеризовать и до сих пор недостаточно изучены. Несмотря на то, что на сегодняшний день проведено немного исследований, данные свидетельствуют о потенциальной связи между отложением НВЛ внутри опухоли и прогрессированием опухоли как на экспериментальных моделях, так и у больных раком человека [109, 110]. С другой стороны, нейтрофилы являются наиболее многочисленными гранулоцитами у человека, составляя более половины циркулирующих лейкоцитов. Многие исследования связывают эти клетки с раком, поскольку они описаны как независимые маркеры прогноза, но, что более важно, известно, что мутации в нормальных клетках не являются исключительными факторами, иницирующими и поддерживающими прогрессирование опухоли. Большинство компонентов НВЛ могут стимулировать рост опухоли, способствовать ангиогенезу и развитию метастазов [111, 112].

Demers et al. впервые сообщили о роли НВЛ в развитии рака [113]. С тех пор, преобладает мнение, о том что НВЛ создаёт эффект проопухолевым путем содействуя пролиферации раковых клеток, дифференцировки, метастазированию и других патологических признаков в различных типах злокачественных опухолей [114, 115]. Далее в исследованиях Zychlinsky et al. сообщалось о связи между НВЛ и раком, из чего следует, что пациенты с саркомой Юинга имели худший прогноз при наличии внутриопухолевых НВЛ [12]. Позже модель на мышах продемонстрировала, что больше нейтрофилов было задействовано в контексте метастазирующих клеток рака груди. Более того, эти метастатические клетки рака молочной железы стимулировали образование НВЛ, которые эффективно ингибировались инъекцией ДНКазы I [113]. Эти результаты были также подтверждены на модели *in vitro*. Трижды отрицательные клетки рака молочной железы были выделены из генетически модифицированной модели мышей и из образцов пациентов, индуцируя НВЛ при совместном культивировании с нейтрофилами мышей и здоровых добровольцев человека. Хотя сети, поддерживающие метастазы, могут образовываться и в отсутствие инфекции, Cools-Lartigue et al. [109] использовали мышиную модель (инъецированную клеточными линиями рака легких) системного сепсиса, вызванного перевязкой слепой кишки и пункцией, для развития макрометастазов, которые впоследствии ослаблялись введением

ингибиторов образования НВЛ, таких как ингибитор ДНКазы I и NE. Авторы также сообщили, что НВЛ было достаточно для увеличения адгезии опухолевых клеток в синусоидах печени и, таким образом, рассматривалось как нейтрофильный адгезивный механизм [116]. Эта группа также исследовала потенциальные механизмы, посредством которых НВЛ участвуют в прогрессировании рака после взаимодействия с циркулирующими опухолевыми клетками, описывая роль интегрина $\beta 1$ в опосредовании адгезии раковых клеток к НВЛ, поскольку этот белок экспрессируется как в НВЛ, так и в опухолевых клетках.

Поскольку адгезивные свойства НВЛ позволяют связывать патоген и тромбоциты, это также может способствовать адгезии опухоли и, следовательно, метастазированию. В целом, в настоящее время известно, что, существование различных популяций иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, включая лейкоциты, лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки и мастоциты, было хорошо задокументировано. В этом контексте есть исследования *in vitro*, демонстрирующие взаимосвязь между НВЛ и другими клетками иммунной системы. НВЛ активируют Т-лимфоциты и дендритные клетки, а также участвуют в рекрутировании дендритных клеток в опухолевую среду и формировании барьера между иммунными клетками и опухолью, а также в подавлении функции первых [116].

Кроме того, рак был связан с тромбозом, который является важной причиной смерти среди этой группы пациентов. Хотя точный механизм остается неизвестным. Некоторые элементы НВЛ могут вызывать активацию тромбоцитов, накопление эритроцитов и высвобождение фактора фон Виллебранда, который известен как один из основных компонентов тромба. Кроме того, данные свидетельствуют о том, что лейкемия и раковые клетки продуцируют факторы, способствующие образованию NET, которые в то же время являются предрасположенностью к тромбозу [89].

Литературный обзор показывает, что НВЛ индуцируется в первичном опухоли. На сегодняшний день представлены доказательства, подтверждающие эту гипотезу. В исследовании Sangaletti et al. [116], пролиферация В-клеток и злокачественная трансформация в контексте аутоиммунного заболевания были усилены образование НВЛ. Что касается пролиферации, авторы демонстрируют, что после стимуляции нейтрофилов для индукции образования НВЛ совместное культивирование с В-клетками приводит к значительному увеличению пролиферации [116]. Такое же наблюдение было сделано при совместном культивировании В-клеток с мышинными нейтрофилами, полученными от аутоиммунных мышей [116]. Эти лейкоциты были склонны к спонтанному НЕТозу [116]. Эти результаты подтверждают прямую пролиферативную роль НВЛ на В-клетках, обеспечивая доказательство концепции, что НВЛ могут напрямую влиять на поведение опухолевых клеток в поддержку продолжающегося роста и развития.

В совокупности представленные данные демонстрируют, что образование НВЛ происходит внутри первичной опухоли и связано с неблагоприятными

клиническими исходами при заболевании человека. На экспериментальном уровне кажется, что нейтрофильная инфильтрация первичной опухоли связана с усиленным ростом. Несколько исследований продемонстрировали повышенную выживаемость и миграцию неопластических клеток в результате локальных взаимодействий опухоль-нейтрофилы. Anna Sophie Decker et al. продемонстрировали на модели рака головы и шеи, что инфильтрирующие опухоль нейтрофилы способны увеличивать выживаемость и миграцию опухолевых клеток за счет усиления их провоспалительных функций, более конкретно за счет высвобождения IL-8 [117]. В другом исследовании Snoderly et al. клеток рака молочной железы, была способна привлекать клетки-предшественники нейтрофилов, а так же, что эти гранулоциты увеличивают локальную выживаемость опухоли за счет секреции хемокинов [118]. Schedel F et al. исследовали механизмы, лежащие в основе увеличения метастатического прогрессирования первичной меланомы кожи после многократного воздействия ультрафиолета. Авторы продемонстрировали воспалительный ответ способствует локальному ангиогенезу и миграции клеток меланомы к эндотелиальным клеткам [119]. Принимая во внимание эти данные, возникает явная возможность того, что НВЛ способствуют прогрессированию опухоли, что в конечном итоге приводит к метастазированию.

Нейтрофилы присутствуют во многих солидных опухолях и вокруг них, [40] и вместе с макрофагами и NK-клетками могут составлять до 80% инфильтрирующих опухоль иммунных клеток. Однако существуют противоречивые мнения о том, связаны ли эти нейтрофилы, связанные с опухолью, с хорошим прогнозом, или они являются неблагоприятным фактором прогрессирования рака. Эта кажущаяся дихотомия может быть прослежена до того факта, что можно выделить два различных подтипа нейтрофилов, связанных с опухолью. Микроокружение опухоли, по-видимому, определяет поляризацию ассоциированных с опухолью нейтрофилов, при этом иммуносупрессивный трансформирующий фактор роста- β индуцирует проопухолевый фенотип N2. С другой стороны, блокада трансформирующего фактора роста- β позволяет клеткам N1 проявлять противоопухолевую активность, включая экспрессию иммуноактивирующих хемокинов и цитокинов, проявление цитотоксичности, опосредование отторжения опухолевых клеток и индукцию противоопухолевой иммунной памяти [120].

Была выдвинута гипотеза, что основное различие между нейтрофилами N1 и N2 заключается не столько в альтернативных путях активации, сколько в более высоком уровне активации нейтрофилов N1, который в конечном итоге заставляет их атаковать опухоль, а не способствовать ее росту [120]. Открытие НВЛ, конечно же, вызывает вопросы, можно ли их отнести к категории N1 или N2 соответственно. Это также еще раз показывает, что функции нейтрофилов в отношении прогрессирования опухоли представляют собой сложное взаимодействие, которое выходит за рамки теоретической конструкции описанного выше фенотипа нейтрофилов N1 и N2. Остается исследовать, может ли функция НВЛ в отношении продвижения или ингибирования опухоли

варьироваться в зависимости от контекста, места и количества их высвобождения. На сегодняшний день многие вопросы, касающиеся НВЛ и роста опухоли, остаются без ответа. Однако, учитывая, что многие НВЛ-ассоциированные белки были изучены в контексте роста и прогрессирования рака до открытия НВЛ [7, 120, 121] возможно, что НВЛ также играют роль в локальном развитии опухоли.

Нейтрофилы обычно воспринимаются как гомогенная популяция терминально дифференцированных эффекторных клеток с ограниченной универсальностью и пластичностью [122]. Однако недавнее исследование [123] нейтрофилы действительно состоят из различных подмножества. При раке нейтрофилы можно условно разделить на две подгруппы в зависимости от их плотности, где нейтрофилы высокой плотности обеспечивают противоопухолевую защиту, а нейтрофилы низкой плотности - опухолевые перmissive и способствуют подавлению иммунитета [124]. Соответственно, которые фенотипически сходны с N1 и N2. Плотность нейтрофилов изменяется в процессе развития в результате их повышенной зернистости и изменения размера клеток. Незрелые нейтрофилы обычно находятся во фракциях низкой плотности (ННП), тогда как зрелые нейтрофилы обнаруживаются во фракциях нормальной / высокой плотности. ННП отсутствуют в крови здоровых людей, появляются только при воспалительных или патологических состояниях [125]. ННП рассматривается как смесь зрелых и незрелых нейтрофилов с измененными функциями и иммуносупрессивными свойствами, такими как стимуляция регуляторных Т-клеток, высвобождение активных форм кислорода, оксида азота и аргиназы, которые будут ингибировать активность эффекторных CD8 + Т-лимфоцитов [126, 127]. Помимо этих механизмов, иммуносупрессивные нейтрофилы, экспрессируют лиганд запрограммированной клеточной смерти [128]. Роль ННП в развитии рака интенсивно изучалась в последние годы, в основном на животных моделях, и было замечено, что это подмножество нейтрофилов также способно способствовать метастазу раковых клеток [129]. Именно ННП обладают необычной способностью высвобождать внеклеточные ловушки нейтрофилов в окружающую среду.

В работах Diana P. Saraiva и др. проведенных на образцах крови с карциномой молочной железы определяет что ННП более активированы, обладают более высокой фагоцитарной способностью, продуцируют больше активных форм кислорода и внеклеточные ловушки нейтрофилов, чем нейтрофилы высокой плотности. [128].

Несмотря на то, что многочисленные экспериментальные данные предполагают про-опухолевый эффект НВЛ на рак, это не означает отсутствие разногласий [129, 130]. Некоторые исследователи утверждали, что базовые НВЛ могут оказывать противоопухолевый эффект, напрямую убивая раковые клетки или ограничивая рост и метастазирование опухоли посредством стимуляции иммунной системы [129]. Кроме того, было показано, что НВЛ ограничивают рост популяций кишечной микробиоты, связанной с раком, тем

самым подавляя пролиферацию и метастазирование клеток колоректального рака [130]. Следовательно, чтобы в конечном итоге использовать НВЛ для лечения рака, необходимо получить больше знаний о точном регулировании НВЛ.

В области лучевой терапии, а также иммунотерапии необходимы биомаркеры для прогнозирования и оценки иммунного ответа [131]. Нейтрофилы составляют значительную часть инфильтрата воспалительных клеток в микроокружении опухоли. Они даже были установлены как наиболее распространенный тип иммунных клеток в микроокружении неплоскоклеточного рака легкого [132, 133]. Отрицательная связь между высокими уровнями TAN (Tumor-associated neutrophils) и неблагоприятной безрецидивной, специфической для рака и общей выживаемостью была описана при различных типах рака [134].

В настоящее время ученые мира начали активно проявлять интерес НВЛ в различных формах рака. Основным вопросом заключается о роли этиопатогенезе НВЛ в онкологии. В работе Chang et al. [135] показали, что опухоль молочной железы, аденокарциномы легких, колоректальные аденокарциномы, клетки рака почек обладают наибольшей экспрессией PAD4. Также было показано, PAD4 локализованный в ядре, цитоплазме и секреторных гранулах нейтрофилов, выделяется в нескольких линиях опухолевых клеток. Механизм, касающийся того, как PAD4 экспортируется из опухолевых клеток и может ли внеклеточный PAD4 стимулировать НВЛ ранее не изучался и находится в стадии изучения [135].

В научном мире мало исследований о НВЛ проведенных у больных с онкологическими заболеваниями. Основные исследования проводятся *in vitro* с метастазами рака на моделях мышей. Поэтому функциональная роль и клиническое значение ДНК ловушек в метастазировании у больных раком остаются неясными.

Исследователи из Китая в работах проведенных в госпитале Сун Ят-Сена (Гуанчжоу, Китай) показали, что НВЛ широко распространены в метастазах в печени пациентов с раком груди и толстой кишки, и что сывороточные НВЛ могут предсказывать возникновение метастазов в печени у пациентов с ранней стадией рака молочной железы [136]. ДНК ловушек действует как хемотаксический фактор для привлечения раковых клеток, а не просто действует как «ловушка» для них; в нескольких моделях мышей было обнаружено, что НВЛ в печени или легких привлекают раковые клетки с образованием отдаленных метастазов [137]. Они идентифицировали трансмембранный белок CCDC25 как рецептор ДНК ловушек на раковых клетках, который воспринимает внеклеточную ДНК. Клинически, показали, что экспрессия CCDC25 на первичных раковых клетках тесно связана с плохим прогнозом для пациентов. В данном исследовании предполагается, что нацеливание на CCDC25 может быть привлекательной терапевтической стратегией для предотвращения метастазирования рака [138].

Члены американской ассоциации содействия, развитию науки изучая модели на мышах, обнаружили, что устойчивое воспаление легких, вызванное воздействием табачного дыма или назальной инстилляцией липополисахарида, превращало диссеминированные, спящие раковые клетки в агрессивно растущие метастазы [114]. Устойчивое воспаление индуцировало образование внеклеточных ловушек нейтрофилов, которые были необходимы для пробуждения дремлющего рака. Механистический анализ показал, что две NET-ассоциированные протеазы, эластаза нейтрофилов и матриксная металлопротеиназа 9, последовательно расщепляют ламинин. Протеолитически ремоделированный ламинин индуцировал пролиферацию спящих раковых клеток за счет активации передачи сигнала интегрин $\alpha 3 \beta 1$. Антитела против NET-ремоделированного ламинина предотвращали пробуждение спящих клеток. А так же они ищут терапию, направленная на предотвращение пробуждения спящих клеток, потенциально может продлить выживаемость больных раком [114].

Тем не менее, на данный момент преобладают исследования о про-онкогенной активности НВЛ в опухолевой прогрессии и метастазировании. Еще одно интересное исследование показывает коллеги из США [137], демонстрируется в аденокарциномах легкого, пищевода и желудка. С помощью аппарата ELISA они измеряли уровни циркулирующего НВЛ в плазме у 60 пациентов с аденокарциномой легких или верхних отделов желудочно-кишечного тракта, ранее не получавших лечения, сравнивали с 15 здоровыми людьми. Результаты исследования показали тенденцию к более высокому уровню циркулирующих НВЛ у онкологических больных с распространенным раком (стадии III и IV пищеводно-желудочного и легкого II и III стадии) по сравнению со здоровым контролем, и значительно более высокие уровни НВЛ у пациентов с распространенным раком (пищеводно-желудочная стадия III и IV и легкое II и III стадии) по сравнению с пациентами с местным заболеванием (пищеводно-желудочная стадия I и II стадии и легкое I стадии) [137]. Не было различий в уровнях НВЛ между пациентами с местным заболеванием и здоровыми людьми из контрольной группы. А так же, в эта группа ученых используют иммунокомпетентные мышинные модели рака легких и желудочно-кишечного тракта, вводили подкожно клетки карциномы легких Льюиса в бок мышей [137]. Наблюдая, еженедельно исследование показало повышение уровня НВЛ в циркулирующей крови мышей, одновременно прогрессирующий опухолевый процесс [137].

В работе Rahmi Oklu et al. обнаружено, что уровни НВЛ в образцах плазмы пациентов с различными типами опухолей, включая рак легких, поджелудочной железы и мочевого пузыря, были выше, чем у здоровых людей [14]. У пациентов с раком легких Li et al. продемонстрировали наличие НВЛ в тканях легких, периферической крови и мокроте [138]. Более того, у пациентов с колоректальным раком уровни НВЛ, продуцируемые нейтрофилами после стимуляции *in vitro*, были значительно выше, чем в контрольной группе здоровых людей, и были связаны с плохим клиническим исходом [139].

В настоящее время прогноз злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) по-прежнему плохой. Современные биомаркеры обладают низкой чувствительностью и специфичностью. Примечательно, что возникновение, прогрессирование и прогноз рака ЖКТ связаны с ключевыми иммунными клетками в микроокружении опухоли, а не только с самими опухолевыми клетками [140]. С другой стороны, микроокружение опухоли является доминирующим фактором множественной лекарственной устойчивости [140]. Yiyin Zhang и другие ученые из Китая [13], в своих работах используя биопсию рака желудка человека и образцы периферической крови, исследовали конкретную ценность НВЛ с клинической точки зрения. Образование НВЛ было обнаружено в тканевом микроокружении и периферической крови у пациентов с опухолью желудка. Количество НВЛ и накопление нейтрофилов снижалось от опухолевой ткани к параопухолевой ткани [13]. Кроме того, уровень НВЛ в периферической крови постепенно снижался в следующих группах пациентов: пациенты с запущенными заболеваниями, пациенты до операции, послеоперационные пациенты, пациенты с доброкачественными заболеваниями и здоровые пациенты [13]. Уровни НВЛ в плазме и сыворотке достоверно коррелировали. В качестве биомаркера сыворотки НВЛ имели лучшую диагностическую ценность, чем карциноэмбриональный антиген (СЕА) и углеводный антиген 19-9 (СА19-9) в раке желудка. Наличие метастазов в лимфатические узлы указывает на высокий уровень НВЛ в сыворотке. Уровень НВЛ в периферической крови был неблагоприятным независимым прогностическим фактором у пациентов с поздними стадиями, получавших лечение первой линии [13]. Таким образом, они продемонстрировали новую диагностическую, терапевтическую и прогностическую ценность НВЛ для пациентов с опухолью желудка.

В исследованиях Richardson et al. [9] проводилась количественная оценка образования НВЛ в крови у пациентов с колоректальным раком и у абсолютно здоровых людей. Значительное увеличение продукции НВЛ в ответ на отсутствие стимуляторов были выявлены у пациентов с колоректальным раком, а так же значительное увеличение продукции НВЛ в было обнаружено у пациентов, у которых развились послеоперационные осложнения [9].

С момента первого открытия НВЛ в 2004 году, все большее число исследователей сосредоточили свое внимание на изучении НВЛ при злокачественных опухолях. К счастью, на сегодняшний день эффекты НВЛ при нескольких популярных типах рака широко раскрыты, чтобы проиллюстрировать всю картину. Важную роль НВЛ в развитии рака за счет модуляции биологических характеристик раковых клеток, включая пролиферацию, дифференциацию и метастазирование, а также индукцию тромбообразования, связанной с опухолью продемонстрировали

К настоящему времени получено значительные знания о биологических особенностях и регуляции образования и механизмах воздействия НВЛ на различных типов опухолей, таких как, рак молочной железы [141], легких [29, 142], поджелудочной железы [143], колоректального рака [140, 144], рак крови

[145, 146], кожи [147]. Однако результаты работ о формировании и функционировании НВЛ в клинической практике в диагностических и терапевтических целях против рака на данный момент не применимы.

Прогностическая связь между нейтрофилией и резистентностью к лечению плохо изучена, при этом большинство исследований сосредоточено на связи с общей выживаемостью пациентов. Апостериорный анализ рандомизированного клинического исследования у пациентов с неоперабельной карциномой поджелудочной железы показал прогностическую связь между нейтрофилией и ростом числа нейтрофилов с местным ответом на химиолучевую терапию по сравнению с химиотерапией [142]. Это подтверждает необходимость проспективной оценки нейтрофилов в клинических испытаниях, что делает нейтрофилы прогностическим биомаркером для потенциальных специфических методов лечения.

Изучение количества и прогностическую важность НВЛ в различных патологических состояниях здоровья, тоже, встречается в работах отечественных ученых. Ученые с кафедры биологической химии НАО МУК исследовали НВЛ у пациентов с бронхиальной астмой [148], пневмонией [108], воспалительных заболеваний почки [107] а так же при раке шейки матки [11]. Выше указанных работ для изучения НВЛ использовались периферическая кровь пациента. При раке шейки матки, показано чувствительность нейтрофилов к химиотерапии и лучевой терапии. Способность формировать сети значительно различалась после лучевой терапии. Добавление химиотерапевтических препаратов в лучевую терапию не увеличило процент НВЛ в крови пациентов данным заболеванием, но стимулировало появление базофильных внеклеточных ловушек.

В последние десятилетия уровень развития медицинской науки позволил достаточно далеко продвинуться в области изучения процессов канцерогенеза, однако необходимо помнить, что при выполнении работ по изучению биологии опухоли *in vitro* существует большое количество условностей, в первую очередь связанных с тем, что при данном подходе не учитываются параметры микроокружения, а также взаимоотношения опухоли с целостным организмом.

Хотя данные свидетельствуют о том, что нейтрофилы сами по себе могут способствовать прогрессированию рака, в дополнение к одной из их основных функций в качестве первой линии защиты во время инфекций, в последнее время образование НВЛ системы, по-видимому, может способствовать развитию метастазов. На сегодняшний день роль НВЛ во многих типах рака не была полностью определена, поскольку исследования описали это взаимодействие в условиях инфекций, хирургического стресса или определенных популяций раковых клеток. К сожалению, многие отчеты были ограничены, потому что они не увенчались успехом обнаружения реальных сетей, так как стандартизированных методов недостаточно. Пациенты с запущенным раком имели более высокие уровни циркулирующих НВЛ, чем здоровые люди и даже пациенты с местным раком [149]. Кроме того, высокие уровни НВЛ были связаны с худшим прогнозом. Высокие уровни

циркулирующих НВЛ при колоректальном раке были связаны с большим количеством послеоперационных осложнений и более высокой частотой рецидивов рака [150]. Инфильтрированные опухолью НВЛ при аденокарциноме протока поджелудочной железы предсказывают плохую послеоперационную выживаемость [151]. При саркоме Юинга пациенты с высокими циркулирующими уровнями НВЛ и отложениями НВЛ в образцах опухолевой ткани были предрасположены к метастазированию и раннему рецидиву после интенсивной химиотерапии [7]. Ян и др. обнаружили, что уровень сывороточных НВЛ предсказывает возникновение метастазов в печень у пациентов с ранними стадиями рака молочной железы [136]. Эти клинические результаты предполагают потенциал НВЛ в качестве биомаркера для диагностики и прогноза, а также в качестве мишени для терапии и вмешательства.

На данный момент обзор литературных данных показывает все проводимые мировые исследования нацелены на определения роли НВЛ при злокачественных опухолях. Все еще многие ученые планируют клинические испытания на регулирования образования НВЛ при онкологических заболеваниях на фоне проводимой терапии. Следовательно исследования с терапевтическим эффектом нацеливание на сети может быть многообещающим подходом против метастазирования опухоли.

Во всех выше указанных научных исследованиях для определения количественного показателя НВЛ в при злокачественном процессе, а так же описания его характеристики использовалась периферическая кровь пациента или плазма крови. В связи с этим, хочется подчеркнуть преимущество данной исследовательской работы, впервые используется ткань опухоли для определения роли НВЛ при колоректальном раке.

Однако, необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять всю природу и механизм НВЛ, чтобы должным образом вмешиваться в их формирование и потенциально улучшать клинические результаты. Уже описанная проопухолевая роль этих сложных структур усиливает их потенциал в качестве нового прогностического маркера рака. Что касается клинических исследований, то значение уровней НВЛ для смертности, клинической стадии и продолжительности жизни больных раком показывает НВЛ в качестве кандидата в биомаркеры рака для ориентира в клинической диагностике. В связи с этим, необходимо улучшить метод обнаружения НВЛ и установить стандарт обнаружения. Трудно определить стимул происхождения НВЛ, что является проблемой при использовании НВЛ в качестве биомаркера рака. Появление более точных дополнительных факторов прогноза могло бы в значительной степени облегчить выбор наиболее целесообразной схемы терапии и усовершенствовать лечение конкретных пациентов онкологическими заболеваниями.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика клинического материала

Основу дизайна исследования составило проспективное, клиническое исследование.

Исследовательская работа выполнена в рамках научно-исследовательской программы проектно-целевого финансирования № BR05236771 «Персонифицированный подход в управлении ряда значимых заболеваний». Данный научный проект одобрен Национальным Научным Советом МЗ РК (03.02.2018) в рамках Конкурса на программно-целевое финансирование по научным, научно-техническим программам на 2018-2020 годы. Реализация данного проекта согласно п.3.10 Договора о совместной деятельности № 121 от 01.09.2017, заключенного между КГП «ООД» г. Караганды и РГП ПХВ «КГМУ» МЗ РК (по проекту).

На базе КГП «Областной онкологический диспансер» г. Караганды по проекту подверглись исследованию 323 пациента за 2018-2020гг. Из них у 97 больных определялся НВЛ, они разделены на 2 группы: 1 группа пациенты без лечения (n=60), 2 группа пациенты с неoadьювантной лучевой терапией (n=37). Проведение исследования было одобрено Комитетом по этике клинических исследований НАО МУК №16 от 29.04.2019г. Все пациенты ознакомлены с сутью исследования и давали информированное добровольное согласие на забор материала: периферической крови, фрагмента опухоли из операционного материала.

Отбор пациентов, включенных в исследование, производился согласно критериям включения и критериям исключения, представленным в таблице 1. Таблица 1 – Критерии включения и исключения

Критерии включения	Критерии исключения
Мужской и женский пол; Возраст от 31 до 60 лет; Верифицированный диагноз КРР Согласие пациента на участие в исследовании Отсутствие выраженной сопутствующей патологией Отсутствие в анамнезе онкологической патологии других локализации	пациенты с декомпенсированными хроническими заболеваниями пациенты с синхронными злокачественными опухолями пациенты в неоперабельном состоянии получающие с паллиативной целью химиотерапию пациенты у которых после проведенного оперативного лечения диагноз колоректальный рак не подтвердился отказ пациентов от участия в исследовании

Распределение больных по возрастным группам представлено в таблице 2. Пик заболеваемости приходится на возраст 51-60 лет (71,13±2,3%; ДИ 70,19:72,69).

Таблица 2 - Распределение больных колоректальным раком по возрасту

Количество больных	Возраст (годах)		
	31-40	41-50	51-60
97	8	20	69
%/ДИ	8,2±0,7 7,47:8,63	20,6±1,2 19,8:20,8	71,13±2,3 70,19:72,69

При распределении по полу пациентов с колоректальным раком небольшое преобладание мужчин – 82 (84,5±2,8%; ДИ 78,8:87,9), женщин – 15 (15,4±2,8%; ДИ 12,4:18,2); казахской национальности – 29 (29,8±2,6%; ДИ 26,1:36,4) пациентов, другой национальности – 68 (70,1±2,6%; ДИ 63,6:73,9) больных.

Распределение больных колоректальным раком по локализации опухоли представлено в таблицах 3,4. Наиболее часто опухоль локализуется в левой половине ободочной кишки (31,9%) и ампулярном отделе прямой кишки (29,8%). В структуре рака ободочной кишки наблюдается наибольшее поражение опухолью сигмовидной кишки (64,0±2,4%), далее восходящий и нисходящие отделы со слепой кишкой, наиболее редко поражаются печеночный и селезеночные углы с поперечно-ободочной кишкой.

Таблица 3 - Распределение больных раком ободочной кишки по локализации опухоли

Количество больных	Локализация опухоли						
	C18.0 слепая	C18.2 восходящий	C18.3 печеноч	C18.4 поперечно	C18.5 селезеноч	C18.6 нисходящ	C18.7 сигма
50	3	4	1	3	3	4	27
%/ДИ	6,0±1,3 5,43:6,25	8,0±1,5 7,58:8,2	2,0±0,8 1,78:2,14	6,0±1,3 5,43:6,25	6,0±1,3 5,43:6,25	8,0±1,5 7,58:8,2	64,0±2,4 60,3:69,9

Таблица 4 - Распределение больных раком прямой кишки по локализации опухоли

Количес тво больных	Локализация опухоли		
	C19 ректосигмоид	C20 ампула	C21.1 промежностный
47	15	29	3
%/ДИ	31,9±1,7 30,64:33,03	61,7±2,6 59,5:63,0	6,3±0,5 5,87:6,7

Наиболее часто при раке прямой кишки опухоль локализуется в ампулярном отделе (61,7±2,6%). В структуре колоректального рака опухоли прямой кишки занимают 48,4%.

Распределение больных по стадиям представлено в таблице 5. С первой стадией заболевания наблюдали 21,6±3,96 % пациентов, со второй – 54,6±4,99

%, с третьей – $17,5 \pm 3,79$ % и с четвертой стадией – $6,1 \pm 2,4$ %. Три четверти пациентов (76,2 %) были с первой и второй стадией.

Таблица 5 - Распределение больных колоректальным раком по стадиям

Клинико-морфологические показатели	Среднее значение $M \pm m$	95% ДИ н	95% ДИв
Стадия опухолевого процесса			
1 стадия	$21,6 \pm 3,96$	18,4	22,99
2 стадия	$54,6 \pm 4,99$	45,57	65,54
3 стадия	$17,5 \pm 3,79$	16,42	17,94
4 стадия	$6,1 \pm 2,4$	5,59	6,55

Согласно стадиями заболевания и степень распространенности пациента выполнены следующие виды оперативного лечения: левосторонняя гемиколэктомия, правосторонняя гемиколэктомия, резекция сигмовидной кишки, резекция прямой кишки, брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки. У 4,97% пациентов выполнена паллиативная операция - наложена петлевая колостома. У одного пациента в плане выполнения комбинированной операции выполнена резекция доли печени с метастатическим поражением.

2.2 Клинические методы исследования больных колоректальным раком

Все исследуемые больные прошли общеклиническое обследование на амбулаторном этапе. Оно включало физикальное обследование пациентов, сбор анализов крови и мочи, рентгенологическое исследование органов грудной клетки; ультразвуковое обследование органов брюшной полости и малого таза, КТ брюшной полости; ирригоскопию, колоноскопию с биопсией с целью верификации диагноза.

Определение состояния больных согласно шкале Карновского не проводилось, так как практически все больных до начала лечения имели относительно удовлетворительное состояние.

Морфологическая верификация опухолей проводилась в цитологической и морфологической лабораториях КГП «Областной онкологический диспансер» г. Караганды. При наличии злокачественной опухоли у всех пациентов имеется гистологическая верификация, преимущественно, аденокарцинома при локализации опухоли в ободочной кишке и ректосигмоидном и ампулярном отделах прямой кишки, при локализации опухоли в промежностном отделе – плоскоклеточная карцинома.

Клинический диагноз устанавливался согласно МКБ10 [152], для классификации стадии рака использовали классификацию TNM, разработанную Международным Противораковым Союзом, версия 2019 года [153].

2.3 Определение внеклеточных нейтрофильных ловушек крови больных колоректальным раком

Всем пациентам, включенным в исследование, производился забор проб №1 (предоперационная) на определение НВЛ, 100% (n=97) пациентов. Забор пробы №2 (послеоперационная) производился на 7-10 сутки после операции. Данный этап осуществлён средним медицинским персоналом КГП «ООД». Кровь из локтевой вены для обследования в количестве 5 мл собиралась системой для забора крови в вакуумные пробирки с цитратом натрия. Далее вакутейнеры с венозной кровью транспортированы на кафедру биомедицины НАО МУК.

Оценка количества индуцированных НВЛ в крови проведена по методу Долгушин И.И. [154] путем добавления пирогенала на предметных стеклах и окрашивался азур - эозином по методу Май-Грюнвальда с последующей микроскопией при увеличении в 100 раз. Подсчет велся на 100 нейтрофилов.

2.4 Определение тканевых внеклеточных нейтрофильных ловушек опухоли у больных колоректальным раком

Мазок-отпечаток изготовлен методом «Определение внеклеточных нейтрофильных ловушек (ВНЛ) в тканях опухоли при колоректальном раке» (Жумалиева В. А., Маратқызы М. , Кабилдина Н. А., Сирота В. Б ., 2020г.) (Приложения А) с рассеченной по центру, периферии опухоли и здоровой ткани в послеоперационном материале на предметных стеклах. Данный этап проводился в ООД незамедлительно после удаления макропрепарата во время оперативного лечения. Мазок-отпечаток транспортировался на кафедру биомедицины НАО МУК и окрашивался также азур - эозином по методу Май-Грюнвальда [156] с микроскопией в световом микроскопе при увеличении в 400 раз с подсчетом внеклеточной ДНК. Подсчет велся в 10 полях зрения. Оценивался как свободнолежащие нити ДНК, так и в контакте с опухолевыми клетками.

Фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду. Назначение: фиксатор-краситель по Май-Грюнвальду в растворе, далее по тексту - фиксатор-краситель, предназначен для применения в качестве фиксатора и красителя форменных элементов крови. Состав: фиксатор-краситель представляет собой 0,30% раствор сухого красителя эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду в метаноле. Проведение определения: Непосредственно перед определением разбавить фиксатор-краситель нейтрализованной водой в соотношении 1:2 - 1:5. Полученный разбавленный раствор фиксатора-красителя можно хранить в течение 6 часов.

На нефиксированные мазки крови налить неразбавленный раствор фиксатора-красителя так, чтобы он покрыл весь мазок. Через 3 мин. смыть фиксатор-краситель нейтрализованной водой и далее красить разбавленным раствором фиксатора-красителя в течение 5-15 мин. По истечении этого времени препараты промыть нейтрализованной водой, высушить на воздухе и микроскопировать.

Окраска форменных элементов крови должна быть следующей:
эритроциты - розовые, розовые с серым или бежевым оттенком, бежево-коричневые;
тромбоциты- розово-фиолетовые или фиолетовые;
ядра лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов и НВЛ - фиолетовые;
цитоплазма лимфоцитов - голубая, серо-голубая или сине-голубая;
цитоплазма моноцитов- серо-голубая;
цитоплазма нейтрофилов - бледно-розовая или розово-серая;
зернистость нейтрофилов - фиолетовая или красно-фиолетовая;
зернистость эозинофилов - оранжево-красная, розово-красная или розово-фиолетовая;
зернистость базофилов – фиолетовая [156]

Оценка количества внеклеточных сетей ДНК проведено совместно с сотрудниками кафедры биомедицины НАО МУК под контролем доктора биологических наук, профессора Муравлёвой Л.Е. После подсчета НВЛ стеклопрепараты были фотографированы докторантом. Фотографии на переносном жестком диске с указанием номера, присвоенного пациенту выборки, а так же стеклопрепараты мазков крови и опухоли хранятся в единственном экземпляре на кафедре онкологии и лучевой диагностики НАО МУК, конфиденциальность сохраняется.

2.5 Методы статистического анализа

Для статистической обработки полученных результатов были использованы процедуры математической статистики, реализованы в прикладных программах «STATISTICA 10.0» и EXCEL [157, 158]. Для доказательства статистических различий при сравнении пар использованы Test χ^2 . Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Для описательной статистики использовали средние величины, ошибки, с доверительным интервалом 25-75% и с поправкой Йетса ($100/(2*N)$).

Основная статистическая обработка включала:

1) Для описания количественных показателей использовались среднее значение и стандартное отклонение в формате « $M \pm S$ ».

2) Статистическая значимость различных значений для бинарных и номинальных показателей определялась с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона.

3) Корреляционный анализ проводился на основе непараметрической ранговой корреляции по Спирмену.

4) Сравнительная характеристика параметров нормального распределения проводилась путем определения коэффициента по t-критерию Стьюдента

5) Выживаемость пациентов с колоректальным раком в зависимости количества в крови и в ткани НВЛ определяли по безинтервальному методу Е. Kaplan - Р. Meier с использованием критерий Гехана-Вилкоксона, F-Сох, Кокса-Ментела, Лог-Рангова, Вилкоксона-Пето.

3 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙТРОФИЛОВ И НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК КРОВИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

3.1 Клинико-морфологическая характеристика больных колоректальным раком

С целью исследования зависимости освобождения НВЛ от степени распространенности рака, глубины инвазии и морфологической степени дифференцировки опухоли были проанализированы перечисленные показатели у больных колоректальным раком. В таблице 6 представлена общая клинико-морфологическая характеристика больных.

Основная часть больных имели начальные стадии рака: 0, 1 и 2 стадии составили $(76,8 \pm 4,2)\%$. Это хороший показатель, связанный с проведением скрининга колоректального рака. По глубине инвазии слизистой опухолью следующее распределение: без инвазии – $(27,3 \pm 4,48)\%$, с инвазией слизистого слоя – $(8,1 \pm 2,74)\%$, с инвазией мышечного слоя – $(5,1 \pm 2,2)\%$, с инвазией серозного слоя – $(28,3 \pm 4,53)\%$ и окружающей клетчатки – $(20,0 \pm 6,76)\%$.

Таблица 6 – Общая клинико-морфологическая характеристика больных колоректальным раком ($M \pm m$; 95% ДИ)

Клинико-морфологические показатели	Среднее значение $M \pm m$	95% ДИ н	95% ДИ в
Стадия опухолевого процесса			
1 стадия	$21,6 \pm 3,96$	18,4	22,99
2 стадия	$54,6 \pm 4,99$	45,57	65,54
3 стадия	$17,5 \pm 3,79$	16,42	17,94
4 стадия	$6,1 \pm 2,4$	5,59	6,55
Глубина инвазии рака в стенку кишки			
Без инвазии слизистой	$27,3 \pm 4,48$	18,32	36,22
Инфильтрация слизистого слоя	$8,1 \pm 2,74$	7,54	8,64
Инфильтрация мышечного слоя	$5,1 \pm 2,2$	4,62	5,5
Инфильтрация серозного слоя	$28,3 \pm 4,53$	19,23	37,36
Инфильтрация окружающей клетчатки	$20,0 \pm 6,76$	27,38	29,2
Инфильтрация соседних органов	$1,0 \pm 1,0$	0,82	1,22
Степень морфологической дифференцировки аденокарциномы			
Высокодифференцированная	$32,3 \pm 4,7$	22,92	41,73
Умеренно-дифференцированная	$43,4 \pm 4,98$	33,47	53,4
Низкодифференцированная	$23,2 \pm 4,24$	22,38	24,09

Высокодифференцированная карцинома диагностирована у $(32,3 \pm 4,7)\%$ пациентов, умеренно-дифференцированная – у $(43,4 \pm 4,98)\%$ и низкодифференцированная – у $(23,2 \pm 4,24)\%$ больных колоректальным раком, практически одинаковое распределение.

Проведено сравнение клинико-морфологических показателей у больных двух групп: больных, получавших перед операцией неoadъювантную лучевую

терапию и пациентов без лучевой терапии, которые сразу подвергались оперативному вмешательству (таблица 7).

По исследуемым показателям группы практически идентичны. При распределении пациентов по степени распространения опухолевого процесса процент пациентов с 1 и 2 стадиями сопоставимы, с 3 стадией рака больше пациентов в группе без неoadъювантной лучевой терапии на 4,5% ($p \leq 0,05$). Также в этой группе имеются пациенты с четвертой стадией ($9,4 \pm 3,64\%$), таковых нет в группе с лучевой терапией.

Таблица 7 – Сравнительная клиничко-морфологическая характеристика больных колоректальным раком с и без неoadъювантной лучевой терапии ($M\% \pm m$; 95% ДИ)

Клинико-морфологические показатели	Больные КРР, получавшие неоадъювантную лучевую терапию	Больные КРР без неоадъювантной лучевой терапии	p
	M%±m/95% ДИ	M%±m/95% ДИ	
Стадия опухолевого процесса			
1 стадия	20,0±6,76 17,77:22,23	18,75±4,88 17,55:19,99	≥0,05
2 стадия	65,7±8,02 49,67:81,76	50,0±6,25 37,5:62,5	≥0,05
3 стадия	14,3±5,92 12,35:16,34	18,75±4,88 17,55:19,99	≤0,05
4 стадия	-	9,4±3,64; 8,48:10,3	
Глубина инвазии рака в стенку кишки			
Без инвазии слизистой	34,29±8,02 18,24:50,33	23,4±5,3 22,13:24,77	≥0,05
Инфильтрация слизистого слоя	5,71±3,92 4,46:7,11	9,38±3,64 8,48:10,31	≤0,05
Инфильтрация мышечного слоя	5,71±3,92 4,46:7,11	4,69±2,64 4,05:5,37	≥0,05
Инфильтрация серозного слоя	34,29±8,02 18,24:50,33	28,13±5,62 16,89:39,37	≥0,05
Инфильтрация окружающей клетчатки	20,0±6,76 17,77:22,33	32,81±5,87 21,07:44,55	≥0,05
Инфильтрация соседних органов	-	1,56±1,55 1,2:1,97	
Степень морфологической дифференцировки аденокарциномы			
Высокодифференцированная	37,14±8,17 20,81:53,48	29,69±5,71 18,26:41,11	≥0,05
Умеренно-дифференцированная	42,86±8,37 26,13:59,59	43,75±6,2 31,35:56,15	≥0,05
Низкодифференцированная	20,0±6,76 17,77:22,33	25,0±5,41 14,18:35,83	≥0,05

По глубине инвазии рака пациенты в обеих группах распределились равномерно, статистически значимых различий не выявлено, кроме пациентов с

инвазией слизистого слоя, которые превалировали на 3,7% у больных без неoadъювантной лучевой терапии ($p \leq 0,05$).

Аналогичная картина выявилась при сравнении пациентов колоректальным раком обеих групп по степени морфологической дифференцировки аденокарциномы, группы идентичны и распределение одинаковое.

Таким образом, группы пациентов с колоректальным раком с и без неoadъювантной лучевой терапии практически идентичны по клинико-морфологическим показателям.

3.2 Характеристика лейкоцитов и нейтрофилов крови у больных колоректальным раком

Прослежено поведение нейтрофилов крови у больных колоректальным раком до и после оперативного вмешательства, оно меняется, что представлено в таблице 8. Отмечается статистически значимое увеличение всех показателей после операции.

Таблица 8 – Общая характеристика нейтрофилов крови у больных колоректальным раком до и после операции ($M \pm m$; 95% ДИ)

Показатели	Среднее значение и ошибка $M \pm m$	95%ДИ н	95%ДИв
Нейтрофилы до операции	$5,93 \pm 0,35$	5,24	6,62
Нейтрофилы после операции	$9,42 \pm 0,48$	8,46	10,37
Лейкоциты крови до операции	$8,17 \pm 0,38$	7,41	8,93
Лейкоциты после операции	$11,32 \pm 0,52$	10,30	12,35
Палочкоядерные до операции	$1,31 \pm 0,23$	0,85	1,78
Палочкоядерные после операции	$2,49 \pm 0,26$	1,97	2,99
Сегментоядерные до операции	$69,37 \pm 1,33$	66,73	72,01
Сегментоядерные до операции	$78,25 \pm 0,94$	76,39	80,11

Проведение сравнение средних показателей лейкоцитов и нейтрофилов крови по Стьюденту (таблица 9).

Таблица 9 – Сравнительная характеристика нейтрофилов крови у больных колоректальным раком до и после операции

Показатели	Среднее значение и стандартное отклонение $M \pm \sigma$	Коэффициент Стьюдента t	Степень свободы сс	Статистическая значимость, p
Нейтрофилы до операции	$6,15 \pm 3,91$			
Нейтрофилы после	$9,83 \pm 4,86$	-5,1198	63	0,000003
Лейкоциты до операции	$8,71 \pm 4,22$			
Лейкоциты после операции	$11,72 \pm 5,09$	-4,0634	63	0,000136
Палочкоядерные до операции	$1,53 \pm 2,48$			

Палочкоядерные после	2,53±2,67	-2,3864	63	0,020030
Сегментоядерные до операции	66,93±13,99			
Сегментоядерные после	78,84±9,35	-5,5374	63	0,000001
* - достоверность отличий с исходными показателями по Стьюденту, $p < 0,05$				

Все лейкоциты и нейтрофилы крови статистически значимо увеличивались после операции. Далее проведена сравнительная характеристика данных показателей у больных колоректальным раком, получавших и не получавших неоадьювантную лучевую терапию до операции (таблица 10, 11).

Таблица 10 – Сравнительная характеристика нейтрофилов крови у больных колоректальным раком до и после операции, получавших неоадьювантную лучевую терапию

Показатели	Среднее значение и стандартное отклонение $M \pm \sigma$	Коэффициент Стьюдента t	Степень свободы cc	Статистическая значимость, p
Нейтрофилы до операции	5,52±2,42			
Нейтрофилы после	8,67±4,65	-3,6009	34	0,000999
Лейкоциты крови до операции	7,18±2,71			
Лейкоциты после операции	10,59±5,22	-3,6145	34	0,000963
Палочкоядерные до операции	0,91±1,96			
Палочкоядерные после	2,40±2,42	-2,9168	34	0,006224
Сегментоядерные до операции	73,83±10,46			
Сегментоядерные после	77,17±9,32	-1,2139	34	0,233166
* - достоверность отличий с исходными показателями по Стьюденту, $p < 0,05$				

Таблица 11 – Сравнительная характеристика нейтрофилов крови у больных колоректальным раком до и после операции без неоадьювантной лучевой терапии

Показатели	Среднее значение и стандартное отклонение $M \pm \sigma$	Коэффициент Стьюдента t	Степень свободы cc	Статистическая значимость, p
Нейтрофилы до операции	6,15±3,91			
Нейтрофилы после	9,83±4,86	-5,1198	63	0,000003
Лейкоциты крови до операции	8,71±4,21			
Лейкоциты после операции	11,72±5,09	-4,0634	63	0,000136
Палочкоядерные до операции	1,53±2,48			
Палочкоядерные после	2,53±2,67	-2,3864	63	0,020030
Сегментоядерные до операции	66,93±13,99			
Сегментоядерные после	78,84±9,35	-5,5374	63	0,000001
* - достоверность отличий с исходными показателями по Стьюденту, $p < 0,05$				

В группе больных колоректальным раком, получавших неоадьювантную лучевую терапию, после операции статистически значимо увеличились показатели нейтрофилов, лейкоцитов и палочкоядерных нейтрофилов, что нельзя сказать о сегментоядерных нейтрофилах, увеличение их незначительное.

В группе больных колоректальным раком, не получавших неоадьювантную лучевую терапию, после операции статистически значимо увеличились все показатели нейтрофилов.

Значимое увеличение нейтрофилов крови в обеих группах больных колоректальным раком хорошо демонстрируют рисунки 1 и 2.

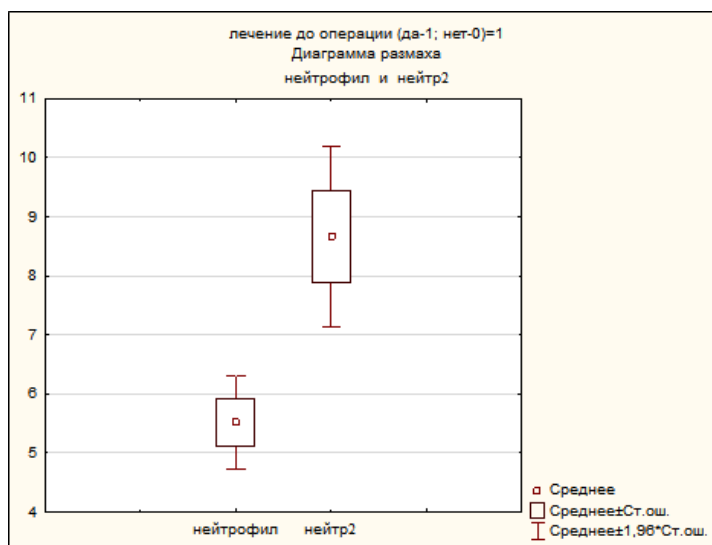


Рисунок 1 – Сравнительная характеристика нейтрофилов крови до и после операции у пациентов с колоректальным раком с неоадьювантной лучевой терапией

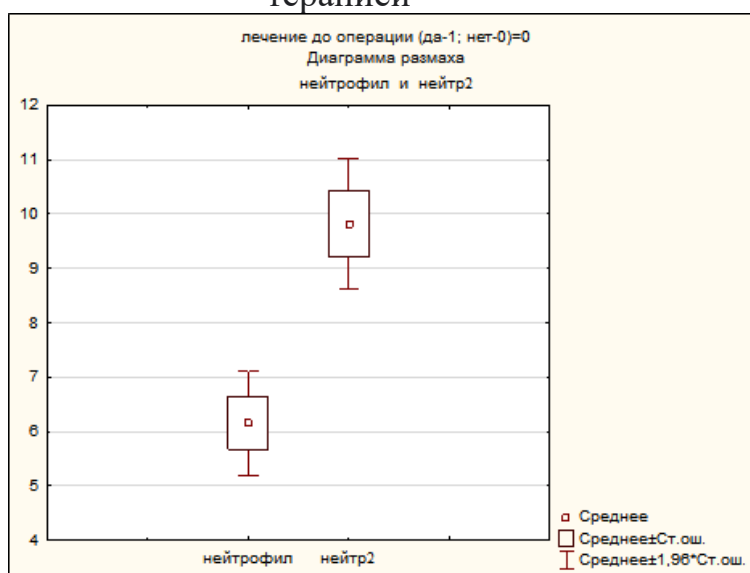


Рисунок 2 – Сравнительная характеристика нейтрофилов крови до и после операции у пациентов с колоректальным раком без неоадьювантной ЛТ

При проведении прямой корреляции по Пирсону между нейтрофилами и лейкоцитами крови у всех пациентов до операции установлена зависимость прямого вида между нейтрофилами и лейкоцитами ($r_p=0,92$; $p\leq 0,05$), палочкоядерными ($r_p=0,24$; $p\leq 0,05$) и сегментоядерными нейтрофилами ($r_p=0,52$; $p\leq 0,05$). После операции наблюдается аналогичная картина: зависимость прямого вида между нейтрофилами и лейкоцитами ($r_p=0,97$; $p\leq 0,05$), палочкоядерными ($r_p=0,47$; $p\leq 0,05$) и сегментоядерными нейтрофилами ($r_p=0,49$; $p\leq 0,05$).

При разделении больных на группы по неоадьювантному лечению наблюдалась аналогичная картина в обеих группах больных, пропадала только корреляция между нейтрофилами крови и палочкоядерными перед операцией ($r_p=0,32$ и $r_p=0,22$ соответственно; $p\geq 0,05$).

При проведении ранговой корреляции по Спирмену между нейтрофилами и лейкоцитами крови у всех больных до операции также выявлена зависимость прямого вида между нейтрофилами и лейкоцитами ($r_s=0,88$; $p\leq 0,05$), палочкоядерными ($r_s=0,22$; $p\leq 0,05$) и сегментоядерными нейтрофилами ($r_s=0,59$; $p\leq 0,05$). После операции наблюдается аналогичная картина: зависимость прямого вида между нейтрофилами и лейкоцитами ($r_s=0,97$; $p\leq 0,05$), палочкоядерными ($r_s=0,50$; $p\leq 0,05$) и сегментоядерными нейтрофилами ($r_s=0,47$; $p\leq 0,05$).

При разделении больных на группы по неоадьювантному лечению при проведении корреляции наблюдалась аналогичная картина в группе больных, получавших лучевую терапию. В группе пациентов без лучевой терапии пропадала корреляция между нейтрофилами крови и палочкоядерными перед операцией ($r_p=0,097$; $p\geq 0,05$).

Таким образом, наблюдается изменение поведения нейтрофилов крови, их статистически значимое увеличение после операции независимо от проведения неоадьювантной лучевой терапии. Нейтрофилы крови имеют прямую корреляцию с лейкоцитами и сегментоядерными нейтрофилами до и после операции независимо от того, было ли проведено неоадьювантное лучевое воздействие.

3.3 Характеристика нейтрофильных внеклеточных ловушек крови у больных колоректальным раком

Общая характеристика нейтрофильных внеклеточных ловушек крови у больных колоректальным раком представлена в таблице 12.

НВЛ крови определялись у больных колоректальным раком перед и после оперативного вмешательства. Средний показатель НВЛ крови до операции ($6,56\pm 0,89$) был несколько ниже по сравнению с таковым после операции ($9,41\pm 1,17$), хотя различия не значимы.

Таблица 12 – Общая характеристика нейтрофильных внеклеточных ловушек крови у больных колоректальным раком ($M\pm m$; 95% ДИ)

Показатели	Среднее значение M±m	95%ДИ н	95%ДИв
НВЛ крови до операции	6,56±0,89	4,80	8,31
НВЛ крови после операции	9,41±1,17	7,09	11,74

Все пациенты колоректальным раком были разделены на две группы: больные, получавшие перед операцией неоадьювантную лучевую терапию, и пациенты без лучевой терапии, которые сразу подвергались оперативному вмешательству. Проведен сравнительный анализ показателей нейтрофильных внеклеточных ловушек крови у больных этих двух групп, насколько они сопоставимы (таблица 13).

Таблица 13 – Сравнительная характеристика нейтрофильных внеклеточных ловушек крови у больных колоректальным раком с неоадьювантной лучевой терапией и без нее (M±m; 95% ДИ)

Исследуемые факторы	Больные КРР с неоадьювантной лучевой терапией	Больные КРР без неоадьювантной лучевой терапии	p
НВЛ крови до операции	7,91±1,61; 4,65:11,18	5,81±1,05; 3,72:7,90	≥0,05
НВЛ крови после операции	9,49±2,10; 5,21:13,76	9,38±1,41; 6,56:12,19	≥0,05

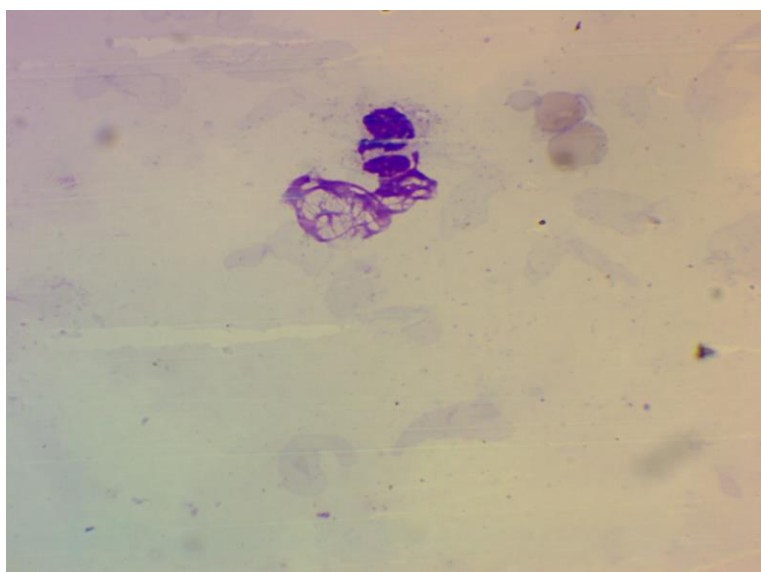


Рисунок 3 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки крови пациента с колоректальным раком с неоадьювантной лучевой терапией до операции (окрашивание азури-эозином по методу Май-Грюнвальда, magnification 1400x)

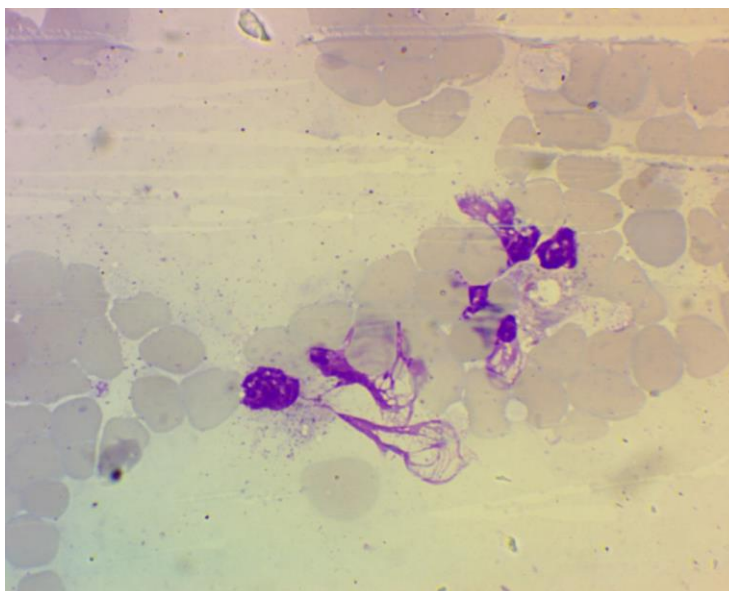


Рисунок 4 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки крови пациента с колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией после операции (окрашивание азур-эозином по методу Май – Грюнвальда, magnification 1400x)

Средний показатель НВЛ крови у больных колоректальным раком в группе с адъювантной лучевой терапией перед операцией ($7,91 \pm 1,61$) был выше, чем таковые у пациентов без лучевой терапии ($5,81 \pm 1,05$), но разница не значима. Средний показатель НВЛ крови после операции выравнивается в обеих группах ($9,49 \pm 2,10$ и $9,38 \pm 1,41$, соответственно), что связано, вероятнее всего, с удалением опухоли.

Далее проведена сравнительная характеристика НВЛ крови по Стьюденту всех больных колоректальным раком и группами по проводимому неoadъювантному лечению до и после операции (таблица 14).

Таблица 14 – Сравнительная характеристика нейтрофильных внеклеточных ловушек в крови у больных колоректальным раком по Стьюденту

НВЛ крови	Среднее значение $M \pm \sigma$	Коэффициент Стьюдента t	Степень свободы сс	Достоверно сть $p \leq 0,05$
НВЛ крови у всех больных до операции	$6,56 \pm 8,80$			
НВЛ крови у всех больных после операции	$9,41 \pm 11,64$	2,0745	98	0,040654
НВЛ крови у больных без лучевой терапии до операции	$5,81 \pm 8,37$			
НВЛ крови у больных без ЛТ после операции	$9,38 \pm 11,28$	2,1007	63	0,039675
НВЛ крови у больных с лучевой терапией до операции	$7,91 \pm 9,51$			
НВЛ крови у больных с ЛТ после операции	$9,49 \pm 12,44$	0,6605	34	0,513407

В общей группе больных колоректальным раком в крови наблюдается статистически значимое увеличение НВЛ с $6,56 \pm 8,80$ до $9,41 \pm 11,64$ после операции ($p \leq 0,05$). Аналогичная картина наблюдается в группе пациентов без неоадьювантной лучевой терапии: рост НВЛ с $5,81 \pm 8,37$ до $9,38 \pm 11,28$ после операции ($p \leq 0,05$). В группе пациентов, получавших неоадьювантную лучевую терапию, имеет место только тенденция к увеличению НВЛ в крови ($p \geq 0,05$). Теоретически можно предположить, что это связано со снижением активности опухоли после лучевой терапии до операции.

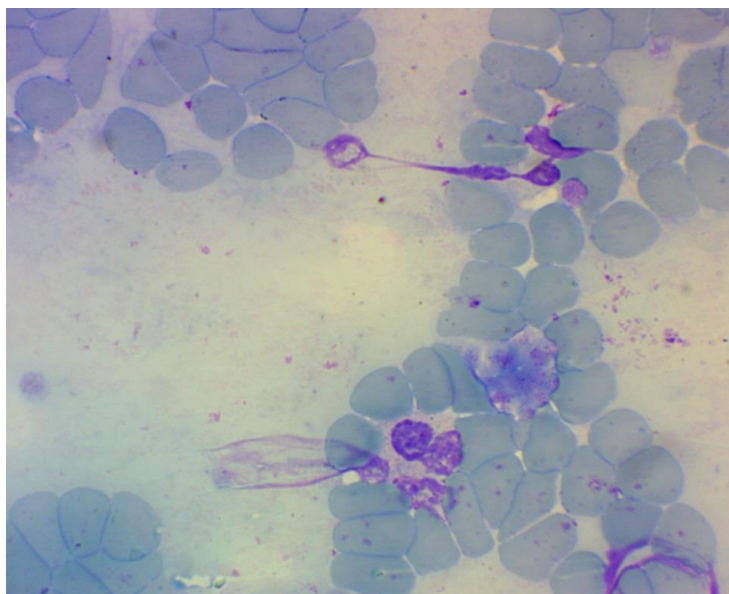


Рисунок 5 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки крови пациента с колоректальным раком без неоадьювантной лучевой терапией до операции (окрашивание азур-эозином по методу Май-Грюнвальда, magnification 1400x)

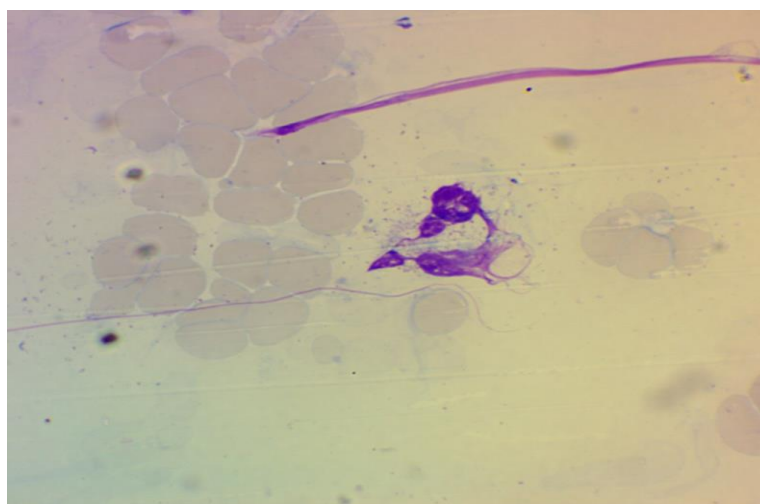


Рисунок 6 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки крови пациента с колоректальным раком без неоадьювантной лучевой терапией после операции (окрашивание азур-эозином по методу Май-Грюнвальда magnification 1400x)

Далее проведена сравнительная количественная характеристика нейтрофильных внеклеточных ловушек крови у больных колоректальным раком с и без неоадьювантной лучевой терапией в зависимости от стадии рака.

При статистической обработке выявлены высокие значения эксцесса и асимметрии (выше 2,0), что указывает на отсутствие нормального распределения выборки и использования для характеристики показателей медианного значения, для сравнения показателей между группами использовали медианный тест, который оценивали через χ^2 .

В таблице 15 представлена количественная характеристика НВЛ крови у больных колоректальным раком в зависимости от стадии рака.

Таблица 15 – Количественная характеристика нейтрофильных внеклеточных ловушек крови у больных колоректальным раком с и без неоадьювантной лучевой терапией в зависимости от стадии рака (Me; 25-75% ДИ)

Показатели	Больные КРР с неoadьювантной лучевой терапией	Больные КРР без неoadьювантной лучевой терапии	p
	Me/25-75%	Me/25-75%	
1 стадия опухолевого процесса			
НВЛ крови до операции	5,0 (5,0; 13,0)	4,0 (0,5; 8,5)	=0,0174
НВЛ крови после операции	0 (0; 0)	5,0 (0; 12,5)	
2 стадия опухолевого процесса			
НВЛ крови до операции	3,5 (0; 11,0)	1,0 (0; 10,0)	≥0,05
НВЛ крови после операции	7,0 (0; 19,0)	6,0 (0; 20,0)	≥0,05
3 стадия опухолевого процесса			
НВЛ крови до операции	8,5 (5,0; 12,0)	4,0 (1,0; 6,5)	≥0,05
НВЛ крови после операции	3,5 (2,0; 15,0)	8,0 (0; 27,0)	≥0,05
4 стадия опухолевого процесса			
НВЛ крови до операции		0 (0; 11,0)	
НВЛ крови после операции		3,0 (1,0; 9,0)	

Медианный показатель НВЛ крови у больных колоректальным раком в сравниваемых группах первой стадии до операции одинаков, после операции в группе с неоадьювантной лучевой терапией НВЛ нет, в группе без лучевой терапии медианный показатель = 5,0 (0; 12,5). Разница статистически значима, медианный тест, $\chi^2=5,6565$, $p=0,0174$ (рисунок 7).

При 2, 3 и 4 стадиях различий медианных показателей НВЛ крови между группами больных колоректальным раком с лучевой терапией и без нее не выявлено.

При проведении корреляции по Пирсону не выявлено связи между НВЛ крови и глубиной инвазии опухоли и степенью морфологической дифференцировки рака ($r_p=-0,05$ и $r_p=0,03$; $p\geq 0,05$) до и после операции у всех пациентов, хотя степень морфологической дифференцировки и глубина инвазии нарастают линейно при увеличении стадии рака.

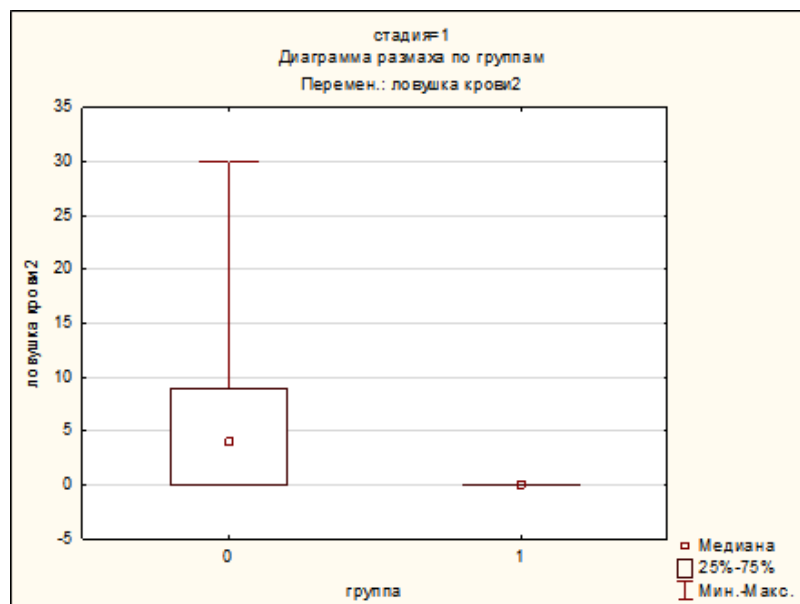


Рисунок 7 – Сравнительная характеристика показателей НВЛ крови у пациентов с колоректальным раком I стадии с и без неoadъювантной лучевой терапии после операции

У всех больных колоректальным раком до операции НВЛ крови имели обратную корреляцию с палочкоядерными нейтрофилами ($r_p = -0,21$; $p \leq 0,05$), что исчезало после операции.

В группе больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией НВЛ крови после операции имели прямую корреляцию по Пирсону с палочкоядерными нейтрофилами ($r_p = 0,34$; $p \leq 0,05$) после операции.

В группе больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии НВЛ крови имели обратную корреляцию по Пирсону с нейтрофилами ($r_p = -0,26$; $p \leq 0,05$) до операции и с лейкоцитами ($r_p = -0,28$; $p \leq 0,05$) после операции

Проведение корреляции по Спирмену у всех больных колоректальным раком выявило, что НВЛ крови имели обратную корреляцию до операции с палочкоядерными нейтрофилами ($r_p = -0,24$; $p \leq 0,05$), а после операции с нейтрофилами ($r_p = -0,21$; $p \leq 0,05$) и лейкоцитами ($r_p = -0,25$; $p \leq 0,05$).

В группе больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией НВЛ крови до операции имели обратную корреляцию по Спирмену с палочкоядерными нейтрофилами до операции ($r_p = -0,42$; $p \leq 0,05$) и прямую корреляцию с сегментоядерными нейтрофилами после операции ($r_p = 0,36$; $p \leq 0,05$). НВЛ крови после операции имели прямую корреляцию по Спирмену со степенью морфологической дифференцировки опухоли ($r_p = 0,39$; $p \leq 0,05$), с нейтрофилами ($r_p = 0,33$; $p \leq 0,05$) и лейкоцитами после операции ($r_p = 0,36$; $p \leq 0,05$).

В группе больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии НВЛ крови до операции имели обратную корреляцию по Спирмену с нейтрофилами ($r_p = -0,28$; $p \leq 0,05$) и лейкоцитами после операции ($r_p = -0,29$; $p \leq 0,05$). НВЛ крови после операции имели обратную корреляцию по Спирмену с палочкоядерными нейтрофилами после операции ($r_p = -0,25$; $p \leq 0,05$).

Таким образом, наблюдается изменение поведения нейтрофилов крови, их статистически значимое увеличение после операции независимо от проведения неoadъювантной лучевой терапии. Нейтрофилы крови имеют прямую корреляцию с лейкоцитами и сегментоядерными нейтрофилами до и после операции независимо от того, было ли проведено неoadъювантное лучевое воздействие.

Средний показатель НВЛ крови у больных колоректальным раком в группе с неадъювантной лучевой терапией перед операцией ($7,91 \pm 1,61$) был выше, чем таковые у пациентов без лучевой терапии ($5,81 \pm 1,05$), но разница не значима. Средний показатель НВЛ крови после операции выравнивается в обеих группах ($9,49 \pm 2,10$ и $9,38 \pm 1,41$, соответственно), что связано, вероятнее всего, с удалением опухоли.

В общей группе больных колоректальным раком в крови наблюдается статистически значимое увеличение НВЛ с $6,56 \pm 8,80$ до операции до $9,41 \pm 11,64$ после операции ($p \leq 0,05$). Аналогичная картина наблюдается в группе пациентов без неoadъювантной лучевой терапии: рост НВЛ с $5,81 \pm 8,37$ до операции до $9,38 \pm 11,28$ после операции ($p \leq 0,05$). В группе пациентов, получавших неoadъювантную лучевую терапию, имеет место только тенденция к увеличению НВЛ в крови после операции ($p \geq 0,05$).

Медианный показатель НВЛ крови у больных колоректальным раком в сравниваемых группах первой стадии после операции в группе без неoadъювантной лучевой терапии выше, чем в группе с лучевой терапией ($\chi^2 = 5,6565$, $p = 0,0174$). При 2, 3 и 4 стадиях различий медианных показателей НВЛ крови между группами больных колоректальным раком с лучевой терапией и без нее не выявлено.

При проведении корреляции по Пирсону у всех пациентов колоректальным раком не выявлено связи до и после операции между НВЛ крови и глубиной инвазии опухоли и степенью морфологической дифференцировки рака ($r_p = -0,05$ и $r_p = 0,03$; $p \geq 0,05$). Но в группе больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией НВЛ крови после операции имели прямую корреляцию по Спирмену со степенью морфологической дифференцировки опухоли ($r_p = 0,39$; $p \leq 0,05$).

В группе больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией НВЛ крови после операции имели прямую корреляцию по Пирсону с палочкоядерными нейтрофилами ($r_p = 0,34$; $p \leq 0,05$) после операции. НВЛ крови до операции имели обратную корреляцию по Спирмену с палочкоядерными нейтрофилами до операции ($r_p = -0,42$; $p \leq 0,05$) и прямую корреляцию с

сегментоядерными нейтрофилами после операции ($r_p=0,36$; $p\leq 0,05$). НВЛ крови после операции имели прямую корреляцию по Спирмену с нейтрофилами ($r_p=0,33$; $p\leq 0,05$) и лейкоцитами после операции ($r_p=0,36$; $p\leq 0,05$).

В группе больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии НВЛ крови до операции имели обратную корреляцию по Пирсону с нейтрофилами ($r_p=-0,26$; $p\leq 0,05$) и лейкоцитами после операции ($r_p=-0,28$; $p\leq 0,05$). НВЛ крови до операции имели обратную корреляцию по Спирмену с нейтрофилами ($r_p=-0,28$; $p\leq 0,05$) и лейкоцитами после операции ($r_p=-0,29$; $p\leq 0,05$). НВЛ крови после операции имели обратную корреляцию по Спирмену с палочкоядерными нейтрофилами после операции ($r_p=-0,25$; $p\leq 0,05$).

4 СПОСОБНОСТЬ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ТКАНЕВЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

4.1 Тканевые нейтрофильные внеклеточные ловушки у больных колоректальным раком с неоадьювантной лучевой терапией

В таблице 16 представлена количественная характеристика тканевых НВЛ у пациентов колоректальным раком, получавших неоадьювантную лучевую терапию. Наибольшее освобождение НВЛ наблюдали в центре опухоли ($13,03 \pm 1,53$) (рисунок 8), количество которых сопоставимо с освобождением НВЛ по периферии опухоли ($10,46 \pm 1,81$) (рисунок 9), в окружающих опухоль здоровых тканях единичные наблюдения ($3,97 \pm 1,32$). Количественное различие НВЛ в центре и по периферии опухоли невыраженные и статистически незначимы, но различие НВЛ с ткани опухоли и здоровых тканей статистически различимы (рисунок 10).

Таблица 16 – Количественная характеристика нейтрофилов и тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных колоректальным раком с неоадьювантной лучевой терапией ($M \pm m$; 95% ДИ)

Показатели	Среднее значение $M \pm m$	95% ДИ н	95% ДИ в
Лейкоциты крови	$7,18 \pm 0,46$	6,25	8,12
Палочкоядерные	$0,91 \pm 0,33$	0,24	1,59
Сегментоядерные	$73,8 \pm 1,77$	70,24	77,43
Нейтрофилы	$5,52 \pm 0,41$	4,69	6,35
НВЛ с центра опухоли	$13,03 \pm 1,53$	9,93	16,13
НВЛ с периферии опухоли	$10,46 \pm 1,81$	6,77	14,14
НВЛ со здоровой ткани	$3,97 \pm 1,32$	1,29	6,66

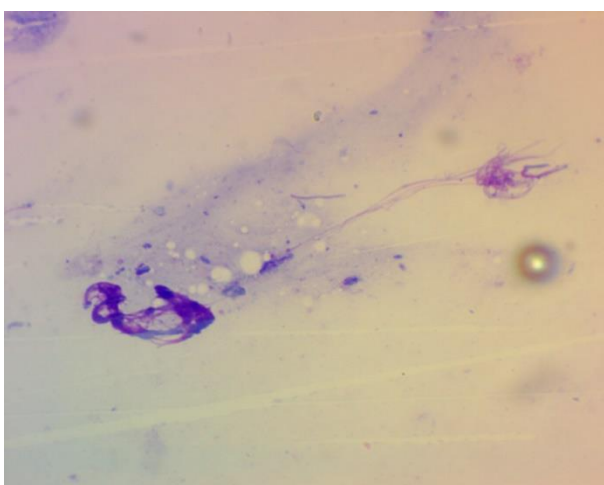


Рисунок 8 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки в центре опухоли пациента с колоректальным раком с неоадьювантной лучевой терапией (окрашивание азур-эозином по методу Май-Грюнвальда, magnification 1400x)

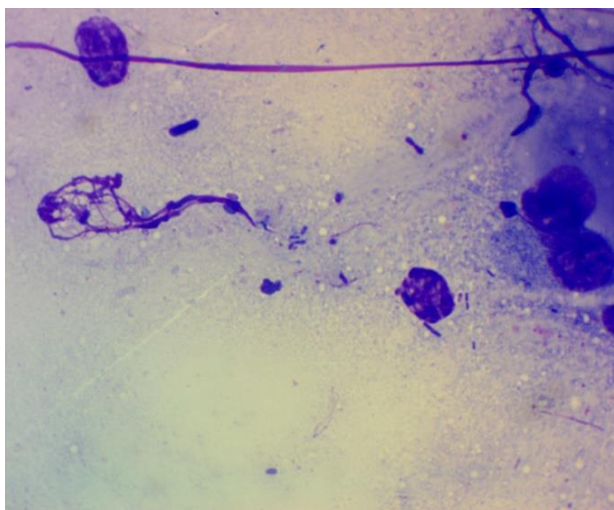


Рисунок 9 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки по периферии опухоли пациента с колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией (окрашивание азур-эозином по методу Май-Грюнвальда magnification 1400x)

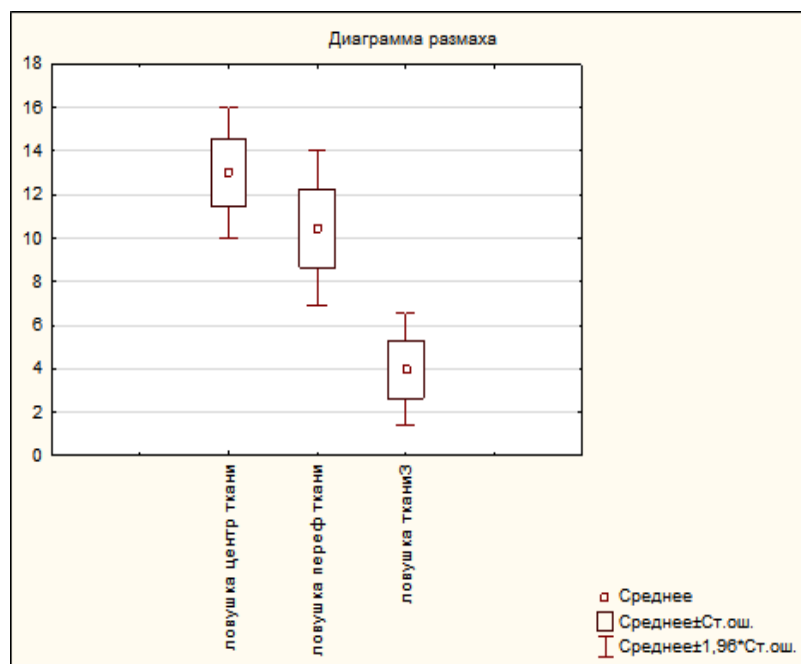


Рисунок 10 – Сравнительная характеристика показателей тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек по центру, периферии опухоли и здоровых тканей у пациентов с колоректальным раком с лучевой терапией (Ранговый ДА Фридмана = 24,20; $p < 0,00001$).

Клинико-морфологическая характеристика колоректального рака в группе пациентов с неoadъювантной лучевой терапией представлена в таблице 17.

Таблица 17 – Клинико-морфологическая характеристика колоректального рака в группе пациентов с неoadъювантной лучевой терапией ($M\% \pm m$; 95% ДИ)

Показатели	Среднее значение M±m	95% ДИ н	95% ДИв
Стадия опухолевого процесса			
1 стадия	20,0±6,76	17,77	22,33
2 стадия	65,71±8,02	49,67	81,76
3 стадия	14,29±5,92	12,35	16,34
Глубина инвазии рака в стенку кишки			
Без инвазии слизистой	34,29±8,02	18,24	50,33
Инфильтрация слизистого слоя	5,71±3,92	4,46	7,11
Инфильтрация мышечного слоя	5,71±3,92	4,46	7,11
Инфильтрация серозного слоя	34,29±8,02	18,24	50,33
Инфильтрация окружающей клетчатки	20,0±6,76	17,77	22,33
Инфильтрация соседних органов	-	-	-
Степень морфологической дифференцировки аденокарциномы			
Высокодифференцированная	37,14±8,17	20,81	53,48
Умеренно-дифференцированная	42,86±8,37	26,13	59,59
Низкодифференцированная	20,0±6,76	17,77	22,33

С первой стадией рака было (20,0±6,76)% пациентов, со II стадией (65,71±8,02)%, с III стадией – (14,29±5,92)% больных. Превалировали пациенты со II стадией рака. Отрадно, что больные с начальными стадиями (I и II) составили 85%.

Высокий процент составили больные без инвазии рака слизистого слоя и больные с инвазией серозного слоя кишки - (по 34,29±8,02)%, низкий процент инвазии слизистого и мышечного слоев - (по 5,71±3,92)%, с инвазией окружающей клетчатки – (20,0±6,76)% пациентов. Все различия статистически значимы.

По степени морфологической дифференцировки рака высокодифференцированная аденокарцинома была у (37,14±8,17)% пациентов этой группы, умереннодифференцированная – у (42,86±8,37)%, низкодифференцированная – у (20,0±6,76)% больных.

В таблице 18 представлена количественная характеристика НВЛ у больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией в зависимости от стадии рака.

При первой стадии рака наибольшее количество НВЛ высвобождается в центре опухоли до значения медианы 21,0 (13,0; 21,0), снижается по периферии опухоли до значения медианы 6,0 (4,0; 12,0) и падает в здоровой ткани до значения медианы 4,0 (3,0; 5,0). Эти различия статистически значимы между НВЛ центра опухоли и периферии ($p \leq 0,05$), центра опухоли и здоровой ткани ($p \leq 0,05$).

При второй стадии рака также наибольшее количество НВЛ высвобождается в центре опухоли до значения медианы -11,5 (6,0; 18,5), снижается по периферии опухоли до значения медианы 6,0 (3,0; 20,5) и падает в

здоровой ткани до 0 (0; 4,0). Эти различия статистически значимы между НВЛ центра опухоли и здоровой ткани ($p \leq 0,05$).

Таблица 18 – Количественная характеристика тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией в зависимости от стадии рака (Me; 25-75% ДИ)

Показатели	Медианное значение Me	25%ДИ	75%ДИ
1 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли	21,0	13,0	21,0
НВЛ с периферии опухоли	6,0	4,0	12,0
НВЛ со здоровой ткани	4,0	3,0	5,0
2 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли	11,5	6,0	18,5
НВЛ с периферии опухоли	6,0	3,0	20,5
НВЛ со здоровой ткани	0,0	0,0	4,0
3 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли	17,0	2,0	25,0
НВЛ с периферии опухоли	4,0	2,0	8,0
НВЛ со здоровой ткани	0,5	0,0	3,0

Аналогичная картина наблюдается и при 3 стадии рака. Наибольшее количество НВЛ высвобождается в центре опухоли до значения медианы -17,0 (2,0; 25,0), снижается по периферии опухоли до значения медианы 4,0 (2,0; 8,5) и падает в здоровой ткани до 0,5 (0; 3,0). Эти различия не значимы между собой.

Таким образом, у больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией наибольшее освобождение НВЛ наблюдается в центре опухоли ($13,03 \pm 1,53$), количество которых сопоставимо с освобождением НВЛ по периферии опухоли ($10,46 \pm 1,81$), в окружающих опухоль здоровых тканях единичные наблюдения ($3,97 \pm 1,32$). Количественное различие НВЛ в центре и по периферии опухоли невыраженные и статистически незначимы, но различие НВЛ с ткани опухоли и здоровых тканей статистически различимы ($p \leq 0,05$).

При первой стадии рака наибольшее количество НВЛ высвобождается в центре опухоли до значения медианы 21,0 (13,0; 21,0), снижается по периферии опухоли до значения медианы 6,0 (4,0; 12,0) и падает в здоровой ткани до значения медианы 4,0 (3,0; 5,0). Эти различия статистически значимы между НВЛ центра опухоли и периферии ($p \leq 0,05$), центра опухоли и здоровой ткани ($p \leq 0,05$).

При второй стадии рака также наибольшее количество НВЛ высвобождается в центре опухоли до значения медианы 11,5 (6,0; 18,5), снижается по периферии опухоли до значения медианы 6,0 (3,0; 20,5) и падает в здоровой ткани до 0 (0; 4,0). Эти различия статистически значимы между НВЛ центра опухоли и здоровой ткани ($p \leq 0,05$).

4.2 Тканевые нейтрофильные внеклеточные ловушки у больных колоректальным раком без неoadьювантной лучевой терапии

В таблице 19 представлена количественная характеристика тканевых НВЛ у пациентов колоректальным раком без неoadьювантной лучевой терапии.

Наибольшее освобождение НВЛ наблюдали на периферии опухоли ($10,86 \pm 1,51$) (рисунок 11), количество которых сопоставимо с освобождением НВЛ в центре опухоли ($9,67 \pm 1,34$) (рисунок 12), в окружающих опухоль здоровых тканях единичные НВЛ ($2,69 \pm 0,59$).

Таблица 19 – Количественная характеристика нейтрофилов и тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных колоректальным раком без неoadьювантной лучевой терапии ($M \pm m$; 95% ДИ)

Показатели	Среднее значение $M \pm m$	95% ДИ н	95% ДИ в
Лейкоциты крови	$8,71 \pm 0,53$	7,65	9,76
Палочкоядерные	$1,53 \pm 0,31$	0,91	2,15
Сегментоядерные	$66,93 \pm 1,75$	63,43	70,42
Нейтрофилы	$6,15 \pm 0,49$	5,18	7,13
НВЛ с центра опухоли	$9,67 \pm 1,34$	6,998	12,35
НВЛ с периферии опухоли	$10,86 \pm 1,51$	7,85	13,87
НВЛ со здоровой ткани	$2,69 \pm 0,59$	1,49	3,88

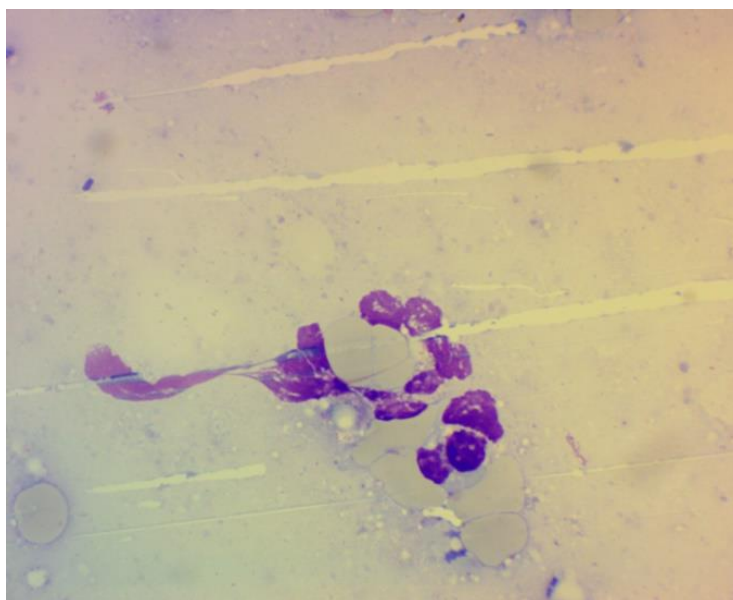


Рисунок 11 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки в центре опухоли пациента с колоректальным раком без неoadьювантной лучевой терапии (окрашивание азур-эозином по методу Май-Грюнвальда, magnification 1400x)

Количественное различие НВЛ в центре и по периферии опухоли невыраженные и статистически незначимы, но различие НВЛ с ткани опухоли и здоровых тканей статистически различимы ($p \leq 0,05$) (рисунок 17).

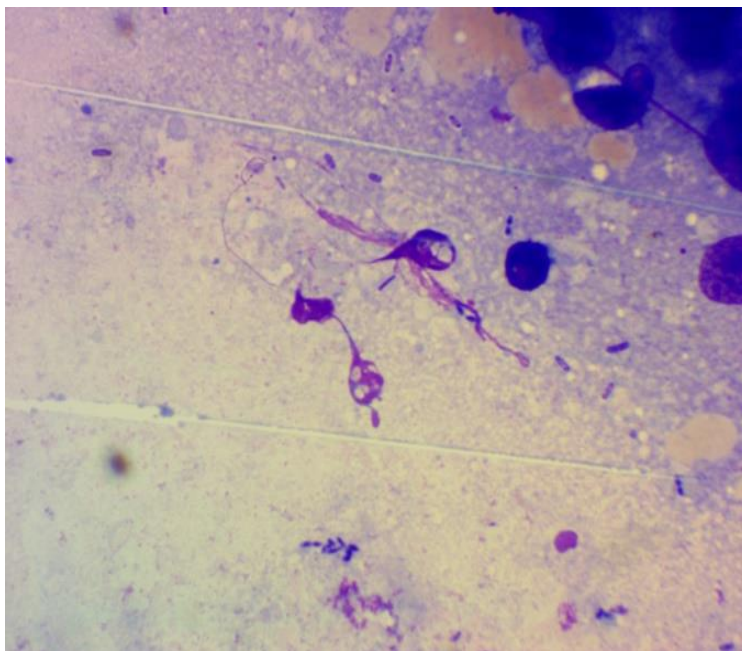


Рисунок 12 – Нейтрофильные внеклеточные ловушки с периферии опухоли пациента с колоректальным раком без неoadьювантной лучевой терапии (окрашивание азур-эозином по методу Май-Грюнвальда, magnification 1400x)

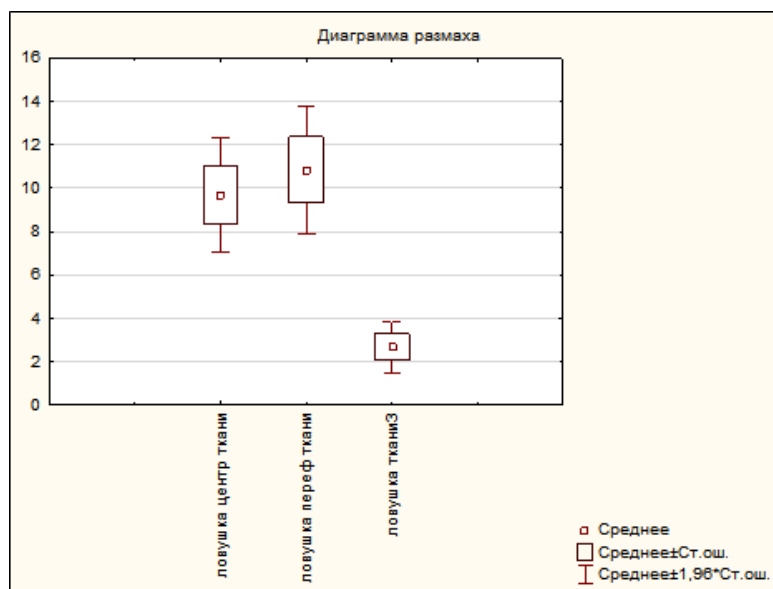


Рисунок 13 – Сравнительная характеристика показателей тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек по центру, периферии опухоли и здоровых тканей у пациентов с колоректальным раком без неoadьювантной лучевой терапии (Ранговый ДА Фридмана = 37,61765; $p < ,00000$)

Клинико-морфологическая характеристика колоректального рака в группе пациентов без неoadьювантной лучевой терапии представлена в таблице 20.

Таблица 20 – Клинико-морфологическая характеристика колоректального рака в группе пациентов без неoadьювантной лучевой терапии ($M\% \pm m$; 95% ДИ)

Показатели	Среднее значение $M \pm m$	95% ДИ н	95% ДИ в
Стадия опухолевого процесса			
0 стадия	$3,1 \pm 2,17$	2,60	3,69
1 стадия	$18,75 \pm 4,88$	17,55	19,99
2 стадия	$50,0 \pm 6,25$	37,5	62,5
3 стадия	$18,75 \pm 4,88$	17,55	19,99
4 стадия	$9,4 \pm 3,64$	8,48	10,31
Глубина инвазии рака в стенку кишки			
Без инвазии слизистой	$23,4 \pm 5,3$	22,13	24,77
Инфильтрация слизистого слоя	$9,38 \pm 3,64$	8,48	10,31
Инфильтрация мышечного слоя	$4,69 \pm 2,64$	4,05	5,37
Инфильтрация серозного слоя	$28,13 \pm 5,62$	16,89	39,37
Инфильтрация окружающей клетчатки	$32,81 \pm 5,87$	21,07	44,55
Инфильтрация соседних органов	$1,56 \pm 1,55$	1,20	1,97
Степень морфологической дифференцировки аденокарциномы			
Высокодифференцированная	$29,69 \pm 5,71$	18,26	41,11
Умеренно-дифференцированная	$43,75 \pm 6,2$	31,35	56,15
Низкодифференцированная	$25,0 \pm 5,41$	14,18	35,83

С первой стадией рака было ($18,75 \pm 4,88$)% пациентов, со II стадией ($50,0 \pm 6,25$)%, с III стадией – ($18,75 \pm 4,88$)% больных. Превалировали пациенты со II стадией рака. Пациенты с начальными стадиями (0, I и II) составили 71,85%. В данной группе больных 9,4% составили пациенты с 4 стадией рака.

Относительно высокий процент составили больные без инвазии рака слизистого слоя кишки – ($23,4 \pm 5,3$)%, низкий процент инвазии слизистого и мышечного слоев – ($9,38 \pm 3,64$ и $4,69 \pm 2,64$, соответственно)%. Пациенты с инвазией серозного слоя составили ($28,13 \pm 5,62$)%, с инвазией окружающей клетчатки – ($32,81 \pm 5,87$)% пациентов.

По степени морфологической дифференцировки рака высокодифференцированная аденокарцинома была у ($29,69 \pm 5,71$)% пациентов этой группы, умереннодифференцированная – у ($43,75 \pm 6,2$)%, низкодифференцированная – у ($25,0 \pm 5,41$)% больных.

В таблице 21 представлена количественная характеристика НВЛ у больных колоректальным раком без неoadьювантной лучевой терапии в зависимости от стадии рака.

При первой стадии рака наибольшее количество НВЛ высвобождается с периферии опухоли до значения медианы – 11,0 (0; 24,0), снижается в центре опухоли до значения медианы 4,0 (0; 25,0) и падает в здоровой ткани до 0. Различия между НВЛ центра опухоли и периферии незначимы, в здоровой

ткани нет выброса НВЛ вообще. То есть, различия между НВЛ центра и периферии опухоли с НВЛ со здоровой ткани статистически значимы ($p \leq 0,05$).

Таблица 21 – Количественная характеристика тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии в зависимости от стадии рака (Me; 25-75% ДИ)

Показатели	Медианное значение Me	25%ДИ	75%ДИ
1 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли	4,0	0,0	25,0
НВЛ с периферии опухоли	11,0	0,0	24,0
НВЛ со здоровой ткани	0,0	0,0	0,0
2 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли	13,0	0,0	19,0
НВЛ с периферии опухоли	11,0	4,0	22,0
НВЛ со здоровой ткани	0,0	0,0	3,0
3 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли	5,0	0,0	11,0
НВЛ с периферии опухоли	5,0	0,0	13,0
НВЛ со здоровой ткани	0,0	0,0	10,0
4 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли	11,0	4,0	16,0
НВЛ с периферии опухоли	8,0	7,0	9,0
НВЛ со здоровой ткани	2,0	0,0	9,0

При второй стадии рака также наибольшее количество НВЛ высвобождается в центре опухоли до значения медианы 13,0 (0; 19,0), незначительно снижается по периферии опухоли до значения медианы 11,0 (4,0; 22,0) и падает в здоровой ткани до 0 (0; 10,0). Различия между НВЛ центра опухоли и периферии незначимы, различия между НВЛ периферии опухоли и со здоровой ткани статистически значимы ($p \leq 0,05$).

При 3 стадии рака наблюдается одинаковое высвобождение НВЛ в центре опухоли до значения медианы 5,0 (0; 11,0) и по периферии опухоли до значения медианы 5,0 (0; 13,0) и падает в здоровой ткани до 0 (0; 10,0). Эти различия не значимы между собой.

При 4 стадии рака максимальное освобождение НВЛ в центре опухоли до значения медианы 11,0 (4,0; 16,0), снижается по периферии опухоли до значения медианы 8,0 (7,0; 9,0) и в здоровой ткани до 2 (0; 9,0). Значения сопоставимы, незначимы.

Таким образом, у больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии наибольшее освобождение НВЛ наблюдается на периферии опухоли ($10,86 \pm 1,51$), количество которых сопоставимо с освобождением НВЛ в центре опухоли ($9,67 \pm 1,34$), в окружающих опухоль здоровых тканях единичные наблюдения ($2,69 \pm 0,59$). Количественное различие НВЛ в центре и

по периферии опухоли невыраженные и статистически незначимы, но различие НВЛ с ткани опухоли и здоровых тканей статистически различимы ($p \leq 0,05$).

При первой стадии колоректального рака без неоадьювантной лучевой терапии наблюдается значимое различие освобождения НВЛ с периферии опухоли до значения медианы 11,0 (0; 24,0) и с центра опухоли до значения медианы 4,0 (0; 25,0) со здоровой ткани, где их нет.

При второй стадии рака также наибольшее количество НВЛ высвобождается в центре опухоли до значения медианы 13,0 (0; 19,0), незначительно снижается по периферии опухоли до значения медианы 11,0 (4,0; 22,0) и падает в здоровой ткани до 0 (0; 10,0). Различия между НВЛ центра опухоли и периферии незначимы, различия между НВЛ периферии опухоли и со здоровой ткани статистически значимы ($p \leq 0,05$).

При 3 и 4 стадиях рака не выявлено никакой закономерности освобождения НВЛ в центре и по периферии опухоли, в здоровой ткани НВЛ практически отсутствуют.

4.3 Общая сравнительная характеристика тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных колоректальным раком

Общая сравнительная характеристика тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек у всех больных колоректальным раком представлена в таблице 22 и рисунке 14.

У всех больных колоректальным раком одинаковое освобождение НВЛ наблюдали с центра и периферии опухоли ($10,86 \pm 1,03$, $10,72 \pm 1,16$, соответственно; $p \geq 0,05$), в окружающих опухоль здоровых тканях единичные НВЛ ($3,14 \pm 0,61$). Количественное различие НВЛ в центре и по периферии опухоли невыраженные и статистически незначимы, но различие НВЛ с ткани опухоли и здоровых тканей статистически различимы ($p \leq 0,05$) (рисунок 15, 16).

Таблица 22 – Общая характеристика тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных колоректальным раком ($M \pm m$; 95% ДИ)

Показатели	Среднее значение $M \pm m$	95%ДИ н	95%ДИв
НВЛ с центра опухоли	$10,86 \pm 1,03$	8,82	12,9
НВЛ с периферии опухоли	$10,72 \pm 1,16$	8,41	13,02
НВЛ со здоровой ткани	$3,14 \pm 0,61$	1,94	4,34

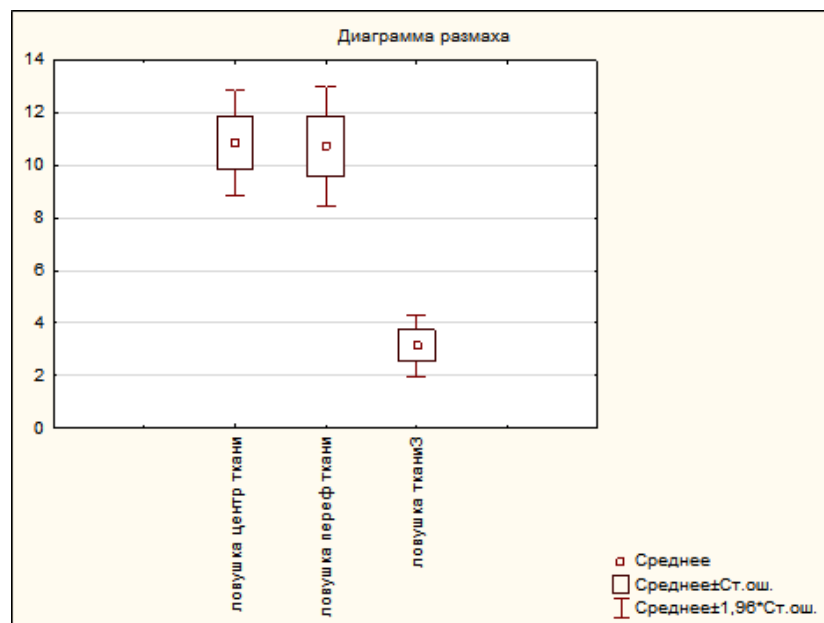


Рисунок 14 – Сравнительная характеристика показателей тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек по центру, периферии опухоли и здоровых тканей у пациентов с колоректальным раком (Ранговый ДА Фридмана = 59,86875; $p < ,00000$; конкордации = ,30237, средн $r = ,29525$)

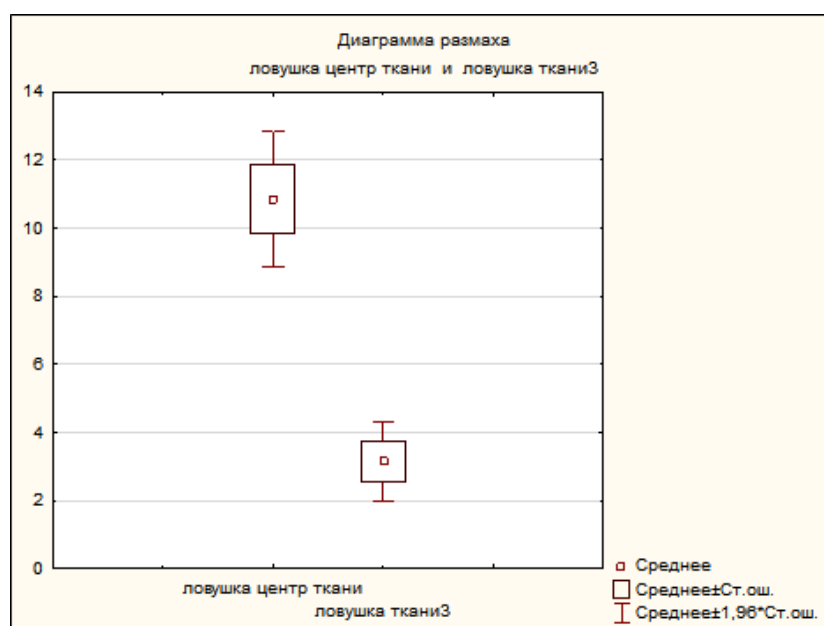


Рисунок 15 – Диаграмма размаха показателей тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек по центру опухоли и здоровых тканей у пациентов с колоректальным раком



Рисунок 16 – Диаграмма размаха показателей тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек по периферии опухоли и здоровых тканей у пациентов с колоректальным раком

В таблице 23 представлена сравнительная характеристика нейтрофильных внеклеточных ловушек опухолевой ткани у больных колоректальным раком без и с неoadъювантной лучевой терапией

Таблица 23 – Сравнительная характеристика нейтрофильных внеклеточных ловушек опухолевой ткани у больных колоректальным раком без и с неoadъювантной лучевой терапией ($M \pm m$; 95% ДИ)

Исследуемые факторы	Больные КРР с неoadъювантной лучевой терапией	Больные КРР без неoadъювантной лучевой терапией	p
НВЛ с центра опухоли	13,03±1,53; 9,93:16,13	9,67±1,34; 6,99:12,35	≥0,05
НВЛ с периферии опухоли	10,46±1,81; 6,77:14,14	10,86±1,51; 7,85:13,87	≥0,05
НВЛ со здоровой ткани	3,97±1,32; 1,29:6,66	2,69±0,59; 1,49:3,88	≥0,05

Показатели НВЛ с центра опухоли несколько выше в группе пациентов с неoadъювантной лучевой терапией ($13,03 \pm 1,53$) по сравнению без нее ($9,67 \pm 1,34$), что видимо связано с проводимой лучевой терапией, но разница статистически не значима. А показатели НВЛ с периферии опухоли одинаковы между собой ($10,46 \pm 1,81$ и $10,86 \pm 1,51$, соответственно).

Показатели НВЛ со здоровой ткани имеют низкие срединные значения ($3,97 \pm 1,32$ и $2,69 \pm 0,59$, соответственно) и статистически значимо отличаются от показателей НВЛ с центра и периферии опухоли в обеих группах больных. При проведении неoadъювантной лучевой терапии проводится защита здоровых

тканей вокруг опухоли от воздействия ионизирующего излучения, что подтверждают полученные результаты.

Далее в таблице 24 представлена количественная характеристика тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных колоректальным раком с и без неоадьювантной лучевой терапии в зависимости от стадии рака.

Таблица 24 – Количественная характеристика тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных колоректальным раком с и без неоадьювантной лучевой терапией в зависимости от стадии рака (Me; 25-75% ДИ)

Показатели	Больные КРР с неoadъювантной лучевой терапией	Больные КРР без неoadъювантной лучевой терапии	p
	Me/25-75%	Me/25-75%	
1 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли	21,0 (13,0; 21,0)	4,0 (0,0; 25,0)	≥0,05
НВЛ с периферии опухоли	6,0 (4,0; 12,0)	11,0 (0; 24,0)	≥0,05
НВЛ со здоровой ткани	4,0 (3,0; 5,0)	0 (0,0; 0,0)	=0,0253
2 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли	11,5 (6,0; 18,5)	13,0 (0; 19,0)	≥0,05
НВЛ с периферии опухоли	6,0 (3,0; 20,5)	11,0 (4,0; 22,0)	≥0,05
НВЛ со здоровой ткани	0 (0,0; 4,0)	0 (0,0; 3,0)	≥0,05
3 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли	17,0 (2,0; 25,0)	5,0 (0,0; 11,0)	≥0,05
НВЛ с периферии опухоли	4,0 (2,0; 8,0)	5,0 (0,0; 13,0)	≥0,05
НВЛ со здоровой ткани	0,5 (0,0; 3,0)	0 (0,0; 10,0)	≥0,05
4 стадия опухолевого процесса			
НВЛ с центра опухоли		11,0 (4,0; 16,0)	
НВЛ с периферии опухоли		8,0 (7,0; 9,0)	
НВЛ со здоровой ткани		2,0 (0,0; 9,0)	

При первой стадии рака показатели НВЛ с центра опухоли в пять раз выше в группе пациентов с неоадьювантной лучевой терапией 21,0 (13,0; 21,0) по сравнению без нее 4,0 (0;25,0), что, видимо, связано с проводимой лучевой терапией, но разница статистически не значима. Показатели НВЛ с периферии опухоли выше в группе без лучевой терапии, но разница также статистически не значима.

Медианный показатель НВЛ в здоровой ткани у больных колоректальным раком при первой стадии в группе без неоадьювантной лучевой терапией равен нулю, в группе с лучевой терапией медианный показатель = 4,0 (3,0; 5,5). Разница статистически значима, медианный тест, $\chi^2=5,0000$, $p=0,0253$.

В группе больных без лучевой терапии при 1, 2, 3 стадиях нет высвобождения НВЛ со здоровой ткани, что, видимо, все-таки связано с отсутствием воздействия лучевой терапии.

При 2, 3 и 4 стадиях не выявлено никакой закономерности освобождения НВЛ в центре и по периферии опухоли у больных с и без неoadъювантного лечения.

При проведении корреляции по Пирсону НВЛ центра опухоли у всех пациентов имели зависимость прямого вида с НВЛ периферии опухоли ($r_p=0,39$; $p\leq 0,05$) и НВЛ здоровой ткани ($r_p=0,297$; $p\leq 0,05$). НВЛ периферии опухоли имели зависимость обратного типа с нейтрофилами крови ($r_p=-0,21$; $p\leq 0,05$) и сегментоядерными лимфоцитами до операции ($r_p=-0,25$; $p\leq 0,05$). НВЛ здоровой ткани прямо коррелировали со степенью морфологической дифференцировки рака ($r_p=0,21$; $p\leq 0,05$).

При разделении больных на группы по неoadъювантному лечению в группе больных с лучевой терапией при корреляции по Пирсону НВЛ центра и периферии опухоли имели зависимость прямого вида с НВЛ здоровой ткани ($r_p=0,42$; $r_p=0,37$, соответственно, $p\leq 0,05$). НВЛ здоровой ткани прямо коррелировали со степенью морфологической дифференцировки рака ($r_p=0,41$; $p\leq 0,05$). НВЛ периферии опухоли имели зависимость обратного типа с сегментоядерными лимфоцитами ($r_p=-0,37$; $p\leq 0,05$).

В группе больных без лучевой терапией при корреляции по Пирсону НВЛ центра опухоли имели зависимость прямого вида с НВЛ периферии опухоли ($r_p=0,48$; $p\leq 0,05$). НВЛ периферии опухоли имели зависимость обратного типа с нейтрофилами крови и сегментоядерными лимфоцитами до операции ($r_p=-0,296$; $r_p=-0,42$, соответственно; $p\leq 0,05$). НВЛ здоровой ткани имели зависимость прямого типа с палочкоядерными и обратного типа с сегментоядерными лимфоцитами до операции ($r_p=0,27$; $r_p=-0,32$, соответственно; $p\leq 0,05$) и обратного типа с палочкоядерными после операции ($r_p=-0,25$; $p\leq 0,05$).

При проведении корреляции по Спирмену НВЛ центра опухоли у всех пациентов имели зависимость прямого вида с НВЛ периферии опухоли ($r_p=0,38$; $p\leq 0,05$) и НВЛ здоровой ткани ($r_p=0,297$; $p\leq 0,45$). НВЛ периферии опухоли имели зависимость обратного типа с нейтрофилами крови ($r_p=-0,24$; $p\leq 0,05$) до операции. НВЛ здоровой ткани имели обратную корреляцию с палочковидными нейтрофилами после операции ($r_p=0,20$; $p\leq 0,05$).

При разделении больных на группы по неoadъювантному лечению в группе больных с лучевой терапией при корреляции по Спирмену НВЛ центра опухоли имели зависимость прямого вида с НВЛ здоровой ткани ($r_p=0,58$; $p\leq 0,05$). НВЛ здоровой ткани имели корреляцию обратного типа с нейтрофилами крови до операции ($r_p=-0,35$; $p\leq 0,05$) и лейкоцитами крови до операции ($r_p=-0,38$; $p\leq 0,05$). НВЛ периферии опухоли имели зависимость обратного типа с сегментоядерными лимфоцитами ($r_p=-0,37$; $p\leq 0,05$).

В группе больных без лучевой терапией при корреляции по Спирмену НВЛ центра опухоли имели зависимость прямого вида с НВЛ периферии опухоли и здоровой ткани ($r_p=0,44$; $r_p=0,40$; соответственно, $p\leq 0,05$) и сегментоядерными нейтрофилами после операции ($r_p=0,30$; $p\leq 0,05$). НВЛ периферии опухоли имели зависимость обратного типа с нейтрофилами крови

и сегментоядерными лимфоцитами до операции ($r_p = -0,295$; $r_p = -0,29$, соответственно; $p \leq 0,05$). НВЛ здоровой ткани имели зависимость обратного типа с палочкоядерными лимфоцитами после операции ($r_p = -0,34$; $p \leq 0,05$).

Таким образом, у больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией наибольшее освобождение НВЛ наблюдается в центре опухоли ($13,03 \pm 1,53$), количество которых сопоставимо с освобождением НВЛ по периферии опухоли ($10,46 \pm 1,81$), в окружающих опухоль здоровых тканях единичные наблюдения ($3,97 \pm 1,32$). Количественное различие НВЛ в центре и по периферии опухоли невыраженные и статистически незначимы, но различие НВЛ с ткани опухоли и здоровых тканей статистически различимы ($p \leq 0,05$).

При первой стадии рака у больных с неoadъювантной лучевой терапией наибольшее количество НВЛ высвобождается в центре опухоли до значения медианы 21,0 (13,0; 21,0), снижается по периферии опухоли до значения медианы 6,0 (4,0; 12,0) и падает в здоровой ткани до значения медианы 4,0 (3,0; 5,0). Эти различия статистически значимы между НВЛ центра опухоли и периферии ($p \leq 0,05$), центра опухоли и здоровой ткани ($p \leq 0,05$).

При второй стадии рака у больных с неoadъювантной лучевой терапией также наибольшее количество НВЛ высвобождается в центре опухоли до значения медианы 11,5 (6,0; 18,5), снижается по периферии опухоли до значения медианы 6,0 (3,0; 20,5) и падает в здоровой ткани до 0 (0; 4,0). Эти различия статистически значимы между НВЛ центра опухоли и здоровой ткани ($p \leq 0,05$).

У больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии наибольшее освобождение НВЛ наблюдается на периферии опухоли ($10,86 \pm 1,51$), количество которых сопоставимо с освобождением НВЛ в центре опухоли ($9,67 \pm 1,34$), в окружающих опухоль здоровых тканях единичные наблюдения ($2,69 \pm 0,59$). Количественное различие НВЛ в центре и по периферии опухоли невыраженные и статистически незначимы, но различие НВЛ с ткани опухоли и здоровых тканей статистически различимы ($p \leq 0,05$).

При первой стадии колоректального рака без неoadъювантной лучевой терапии наблюдается значимое различие освобождения НВЛ с периферии опухоли до значения медианы 11,0 (0; 24,0) и с центра опухоли до значения медианы 4,0 (0; 25,0) со здоровой ткани, где их нет.

При второй стадии рака у больных без неoadъювантной лучевой терапии также наибольшее количество НВЛ высвобождается в центре опухоли до значения медианы 13,0 (0; 19,0), незначительно снижается по периферии опухоли до значения медианы 11,0 (4,0; 22,0) и падает в здоровой ткани до 0 (0; 10,0). Различия между НВЛ центра опухоли и периферии незначимы, различия между НВЛ периферии опухоли и со здоровой ткани статистически значимы ($p \leq 0,05$).

При 3 и 4 стадиях рака в обеих группах не выявлено никакой закономерности освобождения НВЛ в центре и по периферии опухоли, в здоровой ткани НВЛ практически отсутствуют.

У всех больных колоректальным раком одинаковое освобождение НВЛ наблюдали с центра и периферии опухоли ($10,86 \pm 1,03$, $10,72 \pm 1,16$, соответственно; $p \geq 0,05$), в окружающих опухоль здоровых тканях единичные НВЛ ($3,14 \pm 0,61$). Количественное различие НВЛ в центре и по периферии опухоли невыраженные и статистически незначимы, но различие НВЛ с ткани опухоли и здоровых тканей статистически различимы ($p \leq 0,05$).

Показатели НВЛ с центра опухоли несколько выше в группе пациентов с неoadъювантной лучевой терапией ($13,03 \pm 1,53$) по сравнению без нее ($9,67 \pm 1,34$), что, видимо, связано с проводимой лучевой терапией, но разница статистически не значима. А показатели НВЛ с периферии опухоли одинаковы между собой ($10,46 \pm 1,81$ и $10,86 \pm 1,51$, соответственно).

Показатели НВЛ со здоровой ткани имеют низкие срединные значения ($3,97 \pm 1,32$ и $2,69 \pm 0,59$, соответственно) и статистически значимо отличаются от показателей НВЛ с центра и периферии опухоли в обеих группах больных.

Медианный показатель НВЛ в здоровой ткани у больных колоректальным раком при первой стадии в группе без неoadъювантной лучевой терапией равен нулю, в группе с лучевой терапией медианный показатель = 4,0 (3,0; 5,5). Разница статистически значима, медианный тест, $\chi^2 = 5,0000$, $p = 0,0253$. В группе больных без лучевой терапии при 1, 2, 3 стадиях нет высвобождения НВЛ со здоровой ткани, что, видимо, все-таки связано с отсутствием воздействия лучевой терапии. При 2, 3 и 4 стадиях не выявлено никакой закономерности освобождения НВЛ в центре и по периферии опухоли у больных с и без неoadъювантного лечения.

При проведении корреляции по Пирсону НВЛ центра опухоли у всех пациентов имели зависимость прямого вида с НВЛ периферии опухоли ($r_p = 0,39$; $p \leq 0,05$) и НВЛ здоровой ткани ($r_p = 0,297$; $p \leq 0,05$). НВЛ периферии опухоли имели зависимость обратного типа с нейтрофилами крови ($r_p = -0,21$; $p \leq 0,05$) и сегментоядерными лимфоцитами до операции ($r_p = -0,25$; $p \leq 0,05$). НВЛ здоровой ткани прямо коррелировали со степенью морфологической дифференцировки рака ($r_p = 0,21$; $p \leq 0,05$).

5 КОРРЕЛЯЦИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК КРОВИ И ТКАНИ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ

5.1 Отдаленные результаты терапии больных колоректальным раком

Годичная и 2-летняя выживаемость у общей группы больных колоректальным раком составила 87% и 75%, соответственно (рисунок 17).

Выживаемость этих пациентов: 25 перцентиль – 20,94; 50 перцентиль (медиана) – 21,00; 75 перцентиль – 24,00.

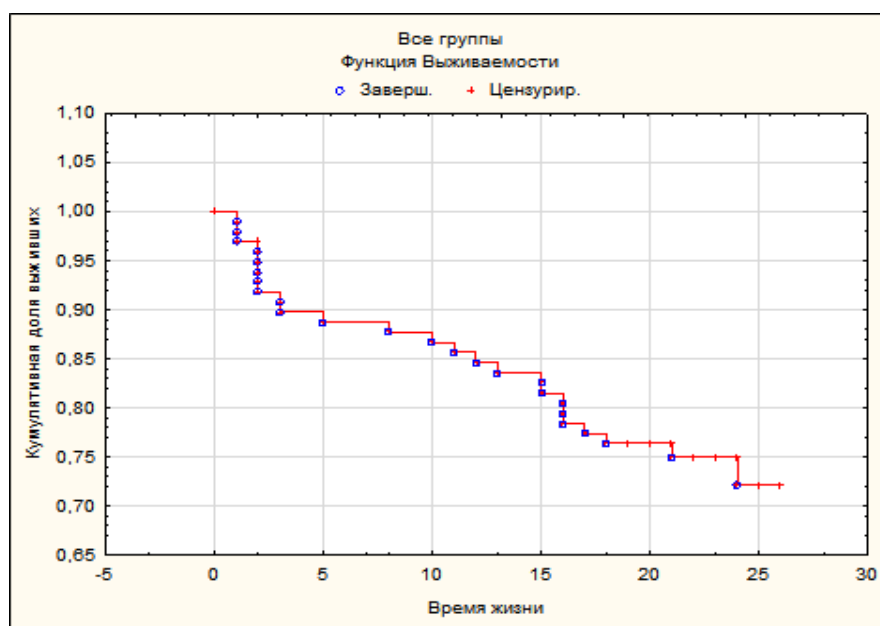


Рисунок 17 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком после комбинированной терапии

У больных, получавших неoadъювантную лучевую терапию, годичная и 2-летняя выживаемость составила 87% и 72% (рисунок 18).

Выживаемость пациентов: 25 перцентиль – 17,5, 50 перцентиль (медиана) – 21,00; 75 перцентиль – 24,00.

У больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии годичная и 2-летняя выживаемость составила, соответственно, 92% и 72% (рисунок 19).

Выживаемость этих пациентов: 25 перцентиль – 18,0, 50 перцентиль (медиана) – 21,00; 75 перцентиль – 23,5.

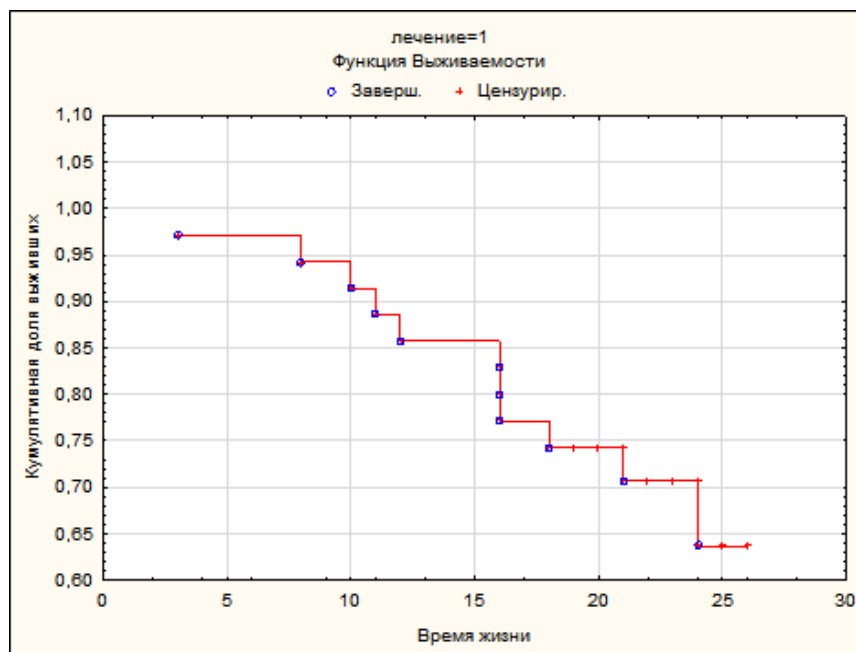


Рисунок 18 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком, получавших неoadъювантную лучевую терапию

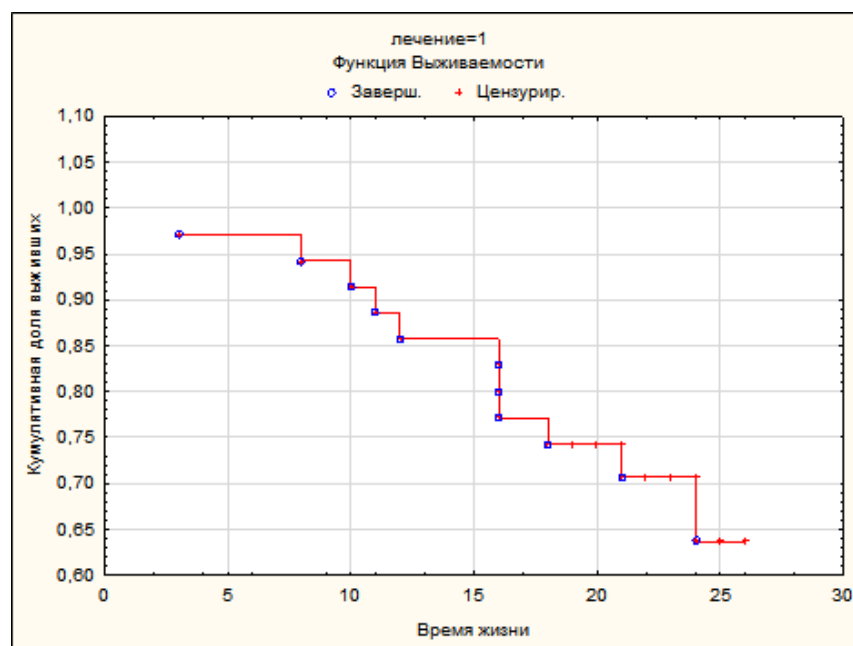


Рисунок 19 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком, не получавших неoadъювантную лучевую терапию

При сравнительном анализе не выявлено статистически значимых различий одногодичной и 2-летней выживаемости у больных, получавших и не получавших неoadъювантную лучевую терапию (рисунок 20) (F-Sох ($p=0,22368$)). В этих группах 2-летняя выживаемость одинаковая.

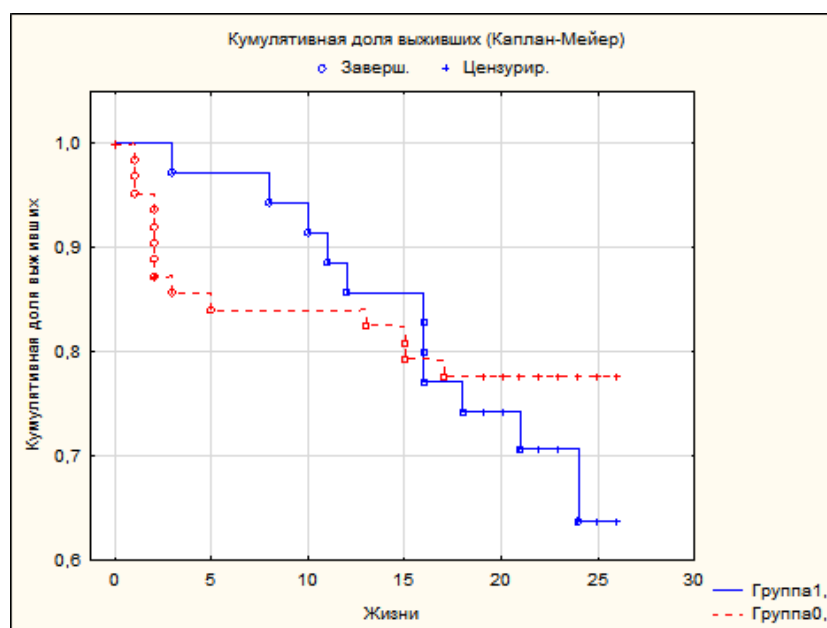


Рисунок 20 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком с (1) и без неoadъювантной лучевой терапии (0)

Оценка модели выживаемости Кокса выполнена по $\chi^2 = 21,29$; $df = 7$; $p = 0,00337$. По экспоненциальной модели Кокса на выживаемость влияют НВЛ здоровой ткани ($p = 0,04894$) и стадия заболевания ($p = 0,01049$). Стадия снижает показатели выживаемости, НВЛ здоровой ткани способствуют увеличению показателя выживаемости.

Таким образом, годовичная и 2-летняя выживаемость у общей группы больных колоректальным раком составила 87% и 75%, соответственно. При сравнительном анализе не выявлено статистически значимых различий одногодичной и 2-летней выживаемости у больных, получавших и не получавших неoadъювантную лучевую терапию (F-Cox $p = 0,22368$). По экспоненциальной модели Кокса на выживаемость влияют НВЛ здоровой ткани ($p = 0,04894$) и стадия заболевания ($p = 0,01049$).

5.2 Влияние количественной регенерации нейтрофильных внеклеточных ловушек крови на выживаемость больных колоректальным раком

Для определения влияния НВЛ крови на выживаемости больных колоректальным раком была определена медиана НВЛ крови в каждой группе: с и без проводимой предоперационной лучевой терапией.

Сначала определили зависимость выживаемости больных от количества НВЛ крови в группе больных, получавших предоперационную лучевую терапию до операции (рисунок 21).

При сравнительном анализе подгрупп (1-медиана 0-5; подгруппа 2 – медиана более 5) не выявлено статистически значимых различий одногодичной и 2-летней выживаемости у больных, получавших неoadъювантную лучевую терапию до операции (рисунок 22) (Критерий F-Cox $p = 0,19148$).

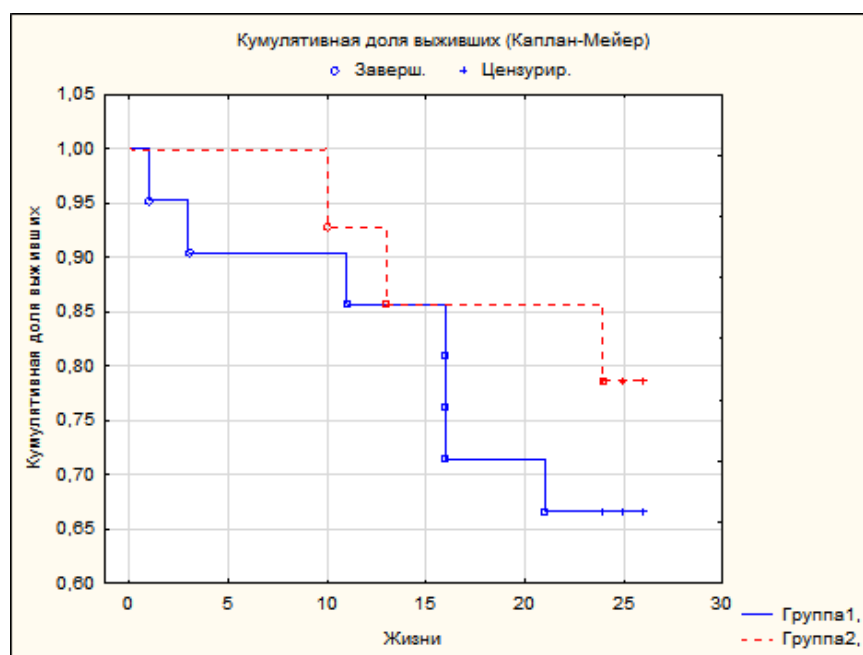


Рисунок 21 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией до операции (подгруппа 1-медиана 0-5; подгруппа 2 – медиана НВЛ крови более 5)

Затем определили зависимость выживаемости больных от количества НВЛ крови в группе больных, получавших предоперационную лучевую терапию после проведенной операции (рисунок 5).

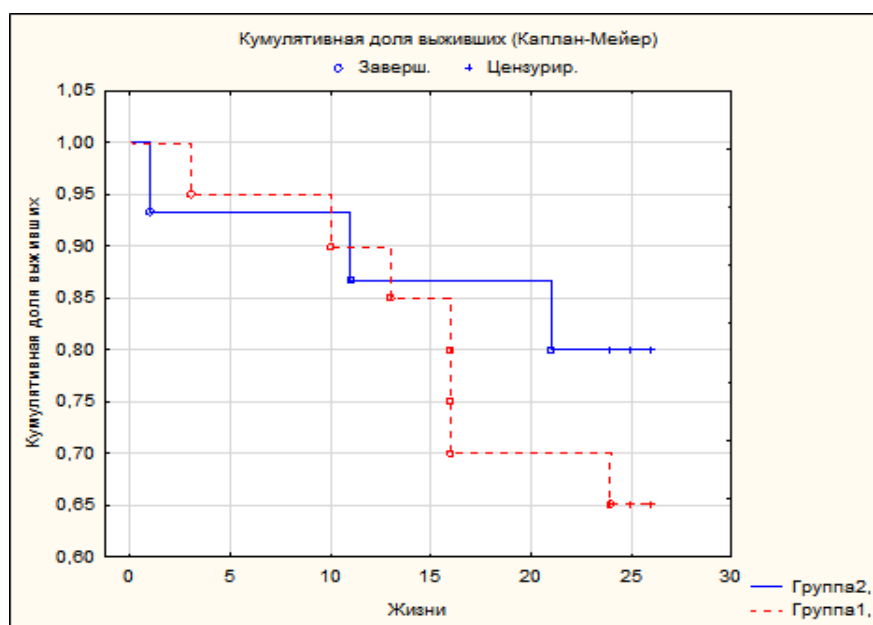


Рисунок 22 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией после операции (подгруппа 1-медиана более 4; подгруппа 2 – медиана НВЛ крови 0-4)

В группе больных колоректальным раком, получавших неoadъювантную лучевую терапию, после операции также не выявлено количественного влияния НВЛ крови на выживаемость. (Критерий F-Cox $p=0,15730$).

Аналогичным способом определили влияние НВЛ крови на выживаемость в группе больных колоректальным раком без лучевой терапии до операции (рисунок 23).

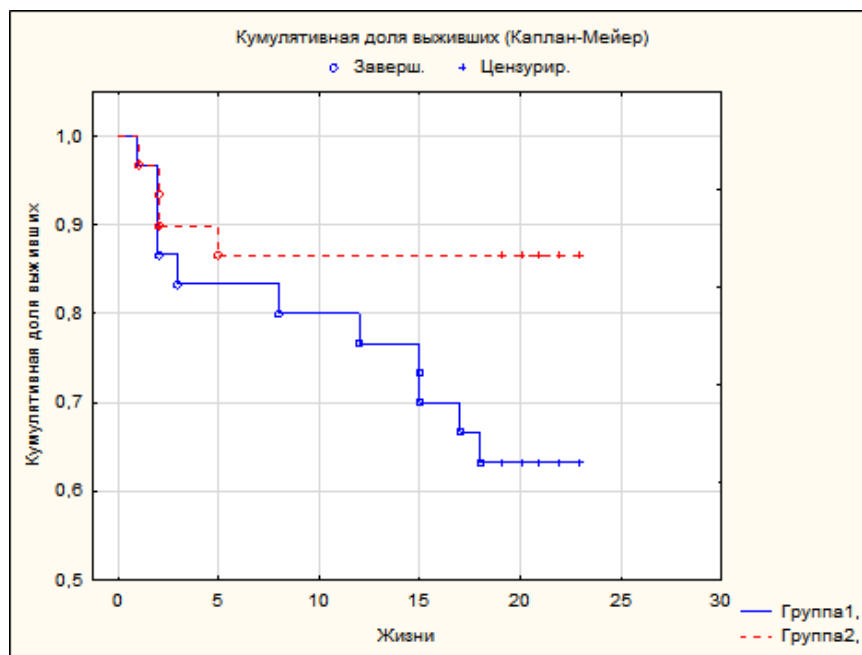


Рисунок 23 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии до операции (подгруппа 1- медиана 0-2; подгруппа 2 – медиана НВЛ крови более 2)

Получили статистически значимое количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в группе больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии до операции. В подгруппе больных с НВЛ крови ниже медианы 2-летняя выживаемость составила 63%, в подгруппе больных с НВЛ крови выше медианы – 88% (Критерий F-Cox $p=0,01962$).

Также определили влияние НВЛ крови на выживаемость в группе больных колоректальным раком без лучевой терапии после операции (рисунок 24). Получили также статистически значимое количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в группе больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии после операции. В подгруппе больных с НВЛ крови ниже медианы 2-летняя выживаемость составила 62%, в подгруппе больных с НВЛ крови выше медианы – 84% (Критерий F-Cox $p=0,02200$). Таким образом, количественное влияние НВЛ крови на выживаемость выявлено в группе больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии.

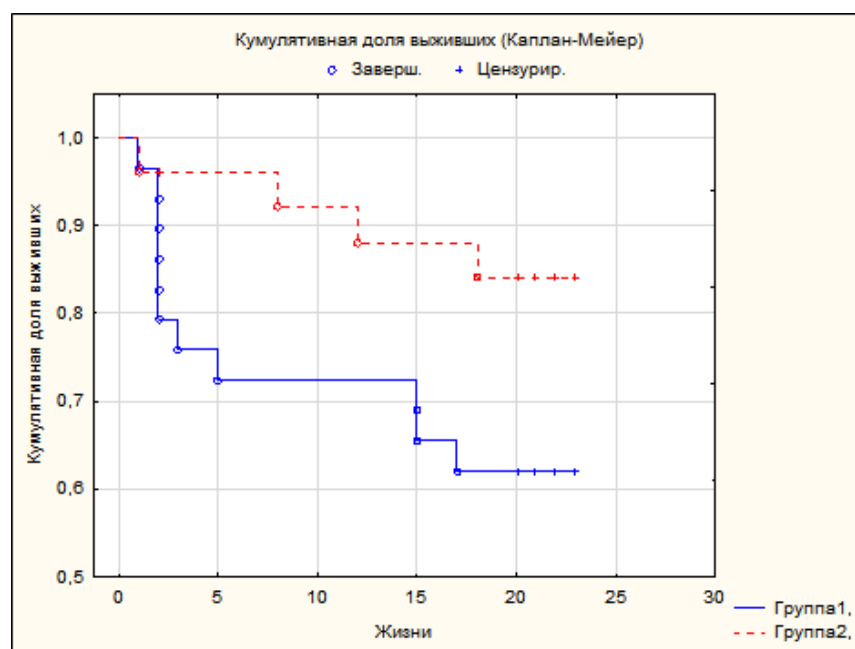


Рисунок 24 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии после операции (подгруппа 1- медиана 0-6; подгруппа 2 – медиана НВЛ крови более 6)

Затем определили влияние НВЛ крови на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком до операции (рисунок 25).

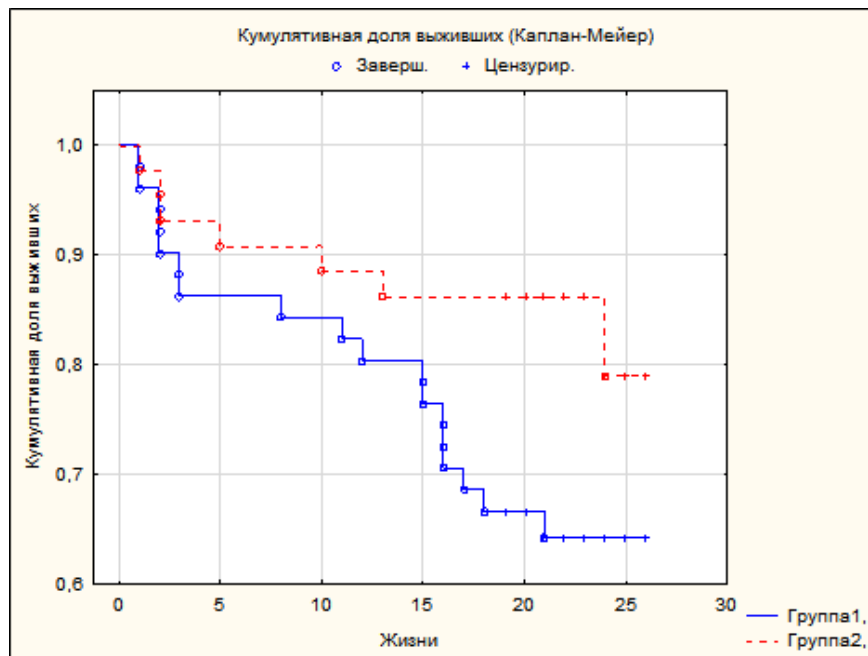


Рисунок 25 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком с и без неoadъювантной лучевой терапии до операции (подгруппа 1- менее медианы; подгруппа 2 – более медианы НВЛ крови)

Получили ярко выраженное количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком с и без неoadъювантной лучевой терапии до операции. В подгруппе больных с НВЛ крови ниже медианы 2-летняя выживаемость составила 64%, в подгруппе больных с НВЛ крови выше медианы – 87%. (Критерий Гехана-Вилкоксона W $p = ,04430$. Критерий F-Сох $p = ,01562$. Крит. Кокса-Ментела $p = ,04841$. Лог-Рангов. Критерий $p = ,04783$).

Аналогичную картину получили при определении влияния НВЛ крови на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком после операции (рисунок 26).

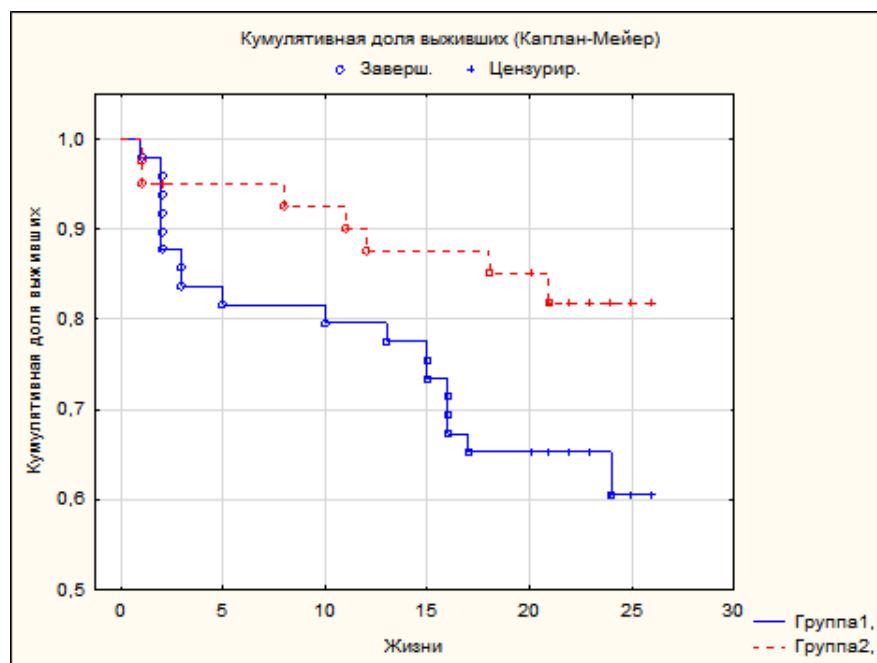


Рисунок 26 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком с и без неoadъювантной лучевой терапии после операции (подгруппа 1- НВЛ крови менее медианы; подгруппа 2 – более медианы НВЛ крови)

Статистически значимо количественное влияние НВЛ крови на выживаемость, она выше у пациентов с НВЛ крови выше медианы. (Критерий F-Сох $p = ,01580$. Крит. Кокса-Ментела $p = ,04928$. Критерий Вилкоксона-Пето $p = ,04890$. Лог-Рангов. Критерий $p = ,04852$).

Таким образом, выявлено количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком и в группе больных без неoadъювантной лучевой терапии.

5.3 Влияние количественного высвобождения тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек опухоли на выживаемость больных колоректальным раком

5.3.1 Выживаемость больных колоректальным раком в зависимости от высвобождения тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек периферии опухоли

Аналогичным способом попробовали выявить влияние тканевых НВЛ на выживаемость. Также была определена медиана тканевых НВЛ в каждой группе: с и без проводимой предоперационной лучевой терапии. По количеству тканевых НВЛ в каждой группе выделяли две подгруппы: менее медианы и более медианы. Определили зависимость выживаемости больных от количества тканевых НВЛ периферии опухоли в группе больных, получавших предоперационную лучевую терапию (рисунок 27).

Не выявлено статистически значимого различия выживаемости в группе больных колоректальным раком от количественной регенерации тканевых НВЛ периферии опухоли в группе пациентов с предоперационной лучевой терапией. (Критерий F-Cox $p = ,11745$).

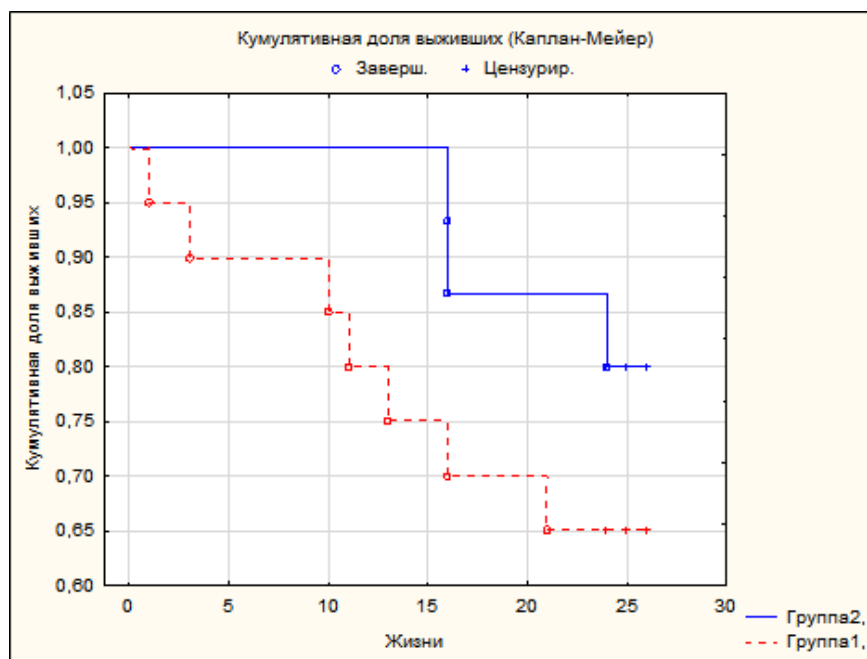


Рисунок 27 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – P. Meier у больных колоректальным раком с неoadьювантной лучевой терапией (подгруппа 2-медиана тканевых НВЛ периферии опухоли 0-5; подгруппа 1 – медиана тканевых НВЛ периферии опухоли более 5)

Определили количественное влияние тканевых НВЛ периферии опухоли на выживаемость больных колоректальным раком в группе больных, не получавших предоперационную лучевую терапию (рисунок 28).

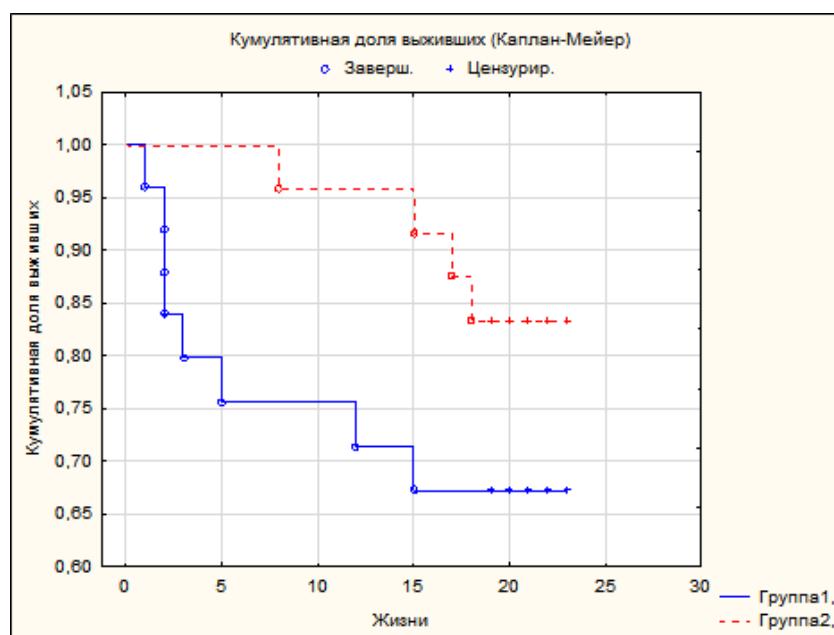


Рисунок 28 -Выживаемость по E. Kaplan – P. Meier у больных колоректальным раком без неoadьювантной лучевой терапии (подгруппа 1-медиана НВЛ периферии опухоли 0-8; подгруппа 2 – медиана более 8)

Также не выявлено статистически значимого различия выживаемости в группе больных колоректальным раком от количественной регенерации тканевых НВЛ периферии опухоли в группе пациентов без предоперационной лучевой терапией. (Критерий F-Cox $p = ,07189$).

Следующим шагом было определение влияния тканевых НВЛ периферии опухоли на выживаемость в общей группе больных (рисунок 29).

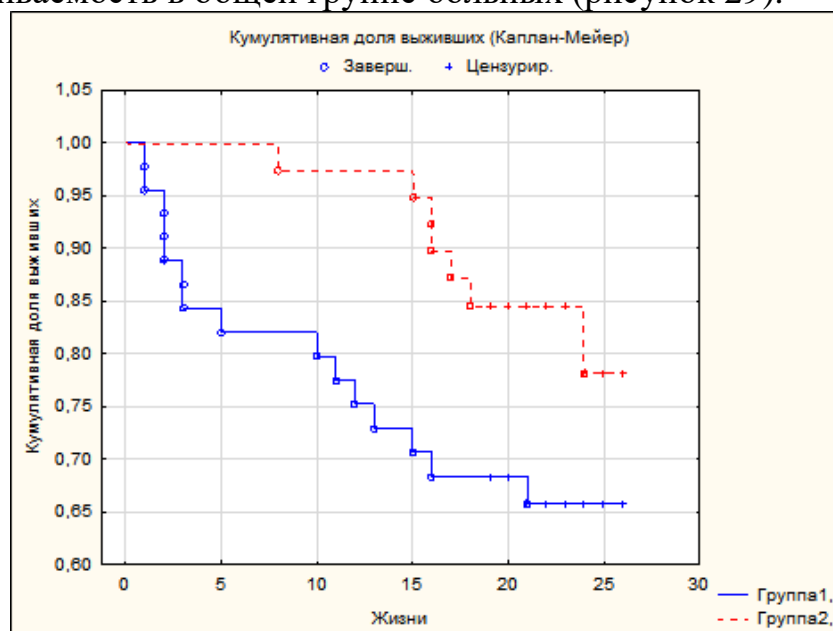


Рисунок 29 - Кумулятивная выживаемость по E. Kaplan – P. Meier в общей группе больных колоректальным раком (группа 1- НВЛ менее медианы; группа 2 – НВЛ периферии опухоли более медианы)

Определена кумулятивная выживаемость у общей группы больных колоректальным раком в зависимости от количества тканевых НВЛ периферии опухоли. Одногодичная выживаемость у пациентов с НВЛ менее медианы составила 80%, двухгодичная - 66%. В группе пациентов с НВЛ более медианы соответственно выживаемость составила 97,5% и 85%.

Критерий Гехана-Вилкоксона $WW = -362,0$ $p = ,03089$. Критерий F-Cox $p = ,03163$. Критерий Вилкоксона-Пето $WW=4,1783$ $p = ,04146$.

Таким образом, выявлено статистически значимое количественное влияние тканевых НВЛ периферии опухоли на выживаемость больных колоректальным раком. Выживаемость выше у пациентов с большим высвобождением тканевых НВЛ периферии опухоли.

5.3.2 Выживаемость больных колоректальным раком в зависимости от высвобождения тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек здоровой ткани вокруг опухоли

Аналогичным способом выполнена попытка определить влияние тканевых НВЛ здоровой ткани вокруг опухоли на выживаемость больных колоректальным раком (рисунок 30).

В группе больных колоректальным раком, получавших неoadъювантную лучевую терапию, не выявлено влияния регенерации НВЛ здоровой ткани вокруг опухоли на выживаемость пациентов (Критерий F-Cox $p = ,42943$).

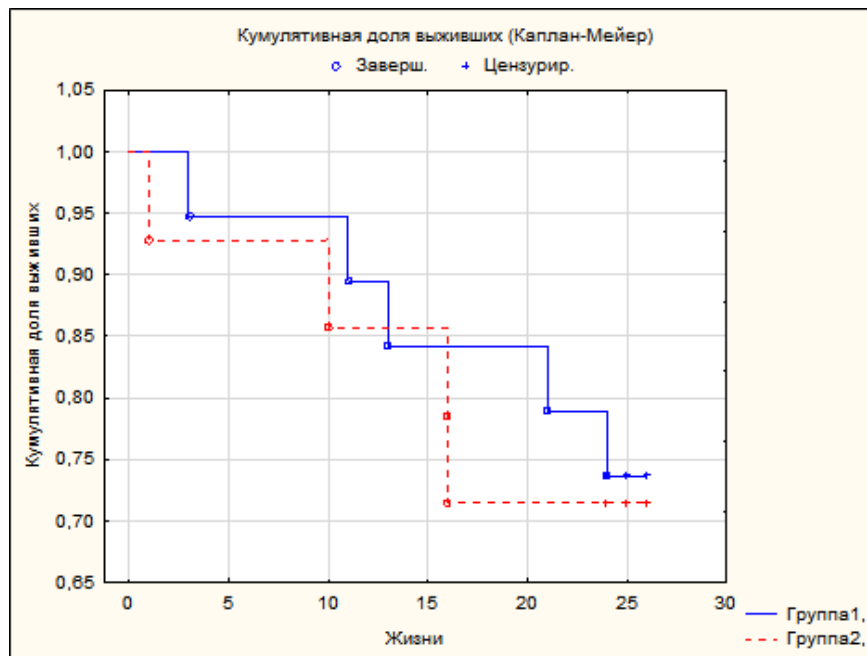


Рисунок 30 -Кумулятивная выживаемость по Е. Kaplan – Р. Meier у больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией (подгруппа 1-медиана тканевых НВЛ здоровой ткани 0; подгруппа 2 – медиана тканевых НВЛ здоровой ткани более 0)

Определена выживаемость в группе пациентов колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии в зависимости от регенерации НВЛ здоровой ткани вокруг опухоли (рисунок 31).

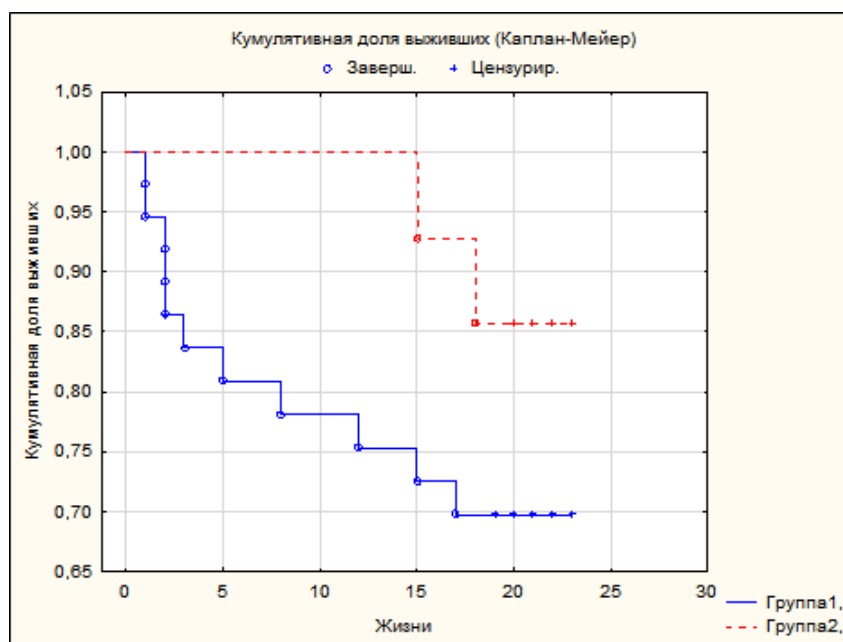


Рисунок 31 - Выживаемость по E. Kaplan – P. Meier у больных колоректальным раком без лучевой терапии (подгруппа 1-медиана тканевых НВЛ здоровой ткани 0; подгруппа 2 – медиана тканевых НВЛ здоровой ткани более 0)

В группе больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии, также не выявлено влияния регенерации НВЛ здоровой ткани вокруг опухоли на выживаемость пациентов (Критерий F-Cox $p = , 07546$).

Определили влияние тканевых НВЛ здоровой ткани на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком (рисунок 32).

Кумулятивная выживаемость в общей группе больных колоректальным раком в зависимости от количества тканевых НВЛ здоровой ткани вокруг опухоли. Одногодичная выживаемость у пациентов с НВЛ менее медианы составила 82,0%, двухгодичная – 67,0%. В группе пациентов с НВЛ более медианы соответственно выживаемость составила 93,0% и 79,0%.

В общей группе больных колоректальным раком также не выявлено влияния регенерации НВЛ здоровой ткани вокруг опухоли на выживаемость пациентов (Критерий F-Cox $p = , 19627$).

Таким образом, количественное высвобождение тканевых НВЛ здоровой ткани вокруг опухоли не оказывает влияния на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком, в группах с и без неoadъювантной лучевой терапии.

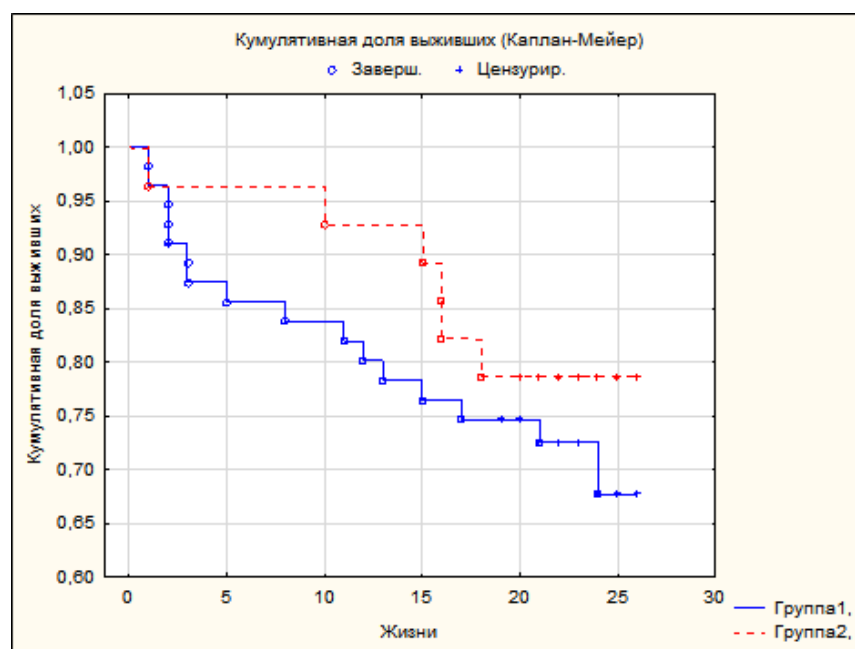


Рисунок 32 - Кумулятивная выживаемость по E. Kaplan – P. Meier в общей группе больных колоректальным раком (подгруппа 1- медиана тканевых НВЛ здоровой ткани 0; подгруппа 2 – более 0)

5.3.3 Выживаемость больных колоректальным раком в зависимости от высвобождения тканевых нейтрофильных внеклеточных ловушек центра опухоли

Выполнена попытка определить влияние тканевых НВЛ центра опухоли на выживаемость больных колоректальным раком.

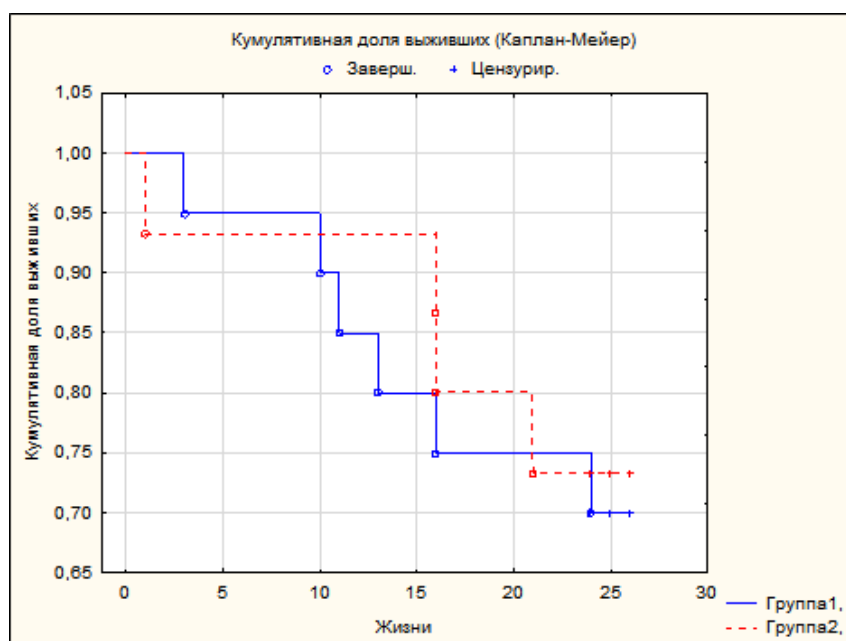


Рисунок 33 - Кумулятивная выживаемость по E. Kaplan – P. Meier у больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией (подгруппа 1-медиана тканевых НВЛ центра опухоли 0-13; подгруппа 2 –более 13)

В группе больных колоректальным раком, получавших предоперационную лучевую терапию, не выявлено влияния количественного высвобождения НВЛ центра опухоли на выживаемость пациентов (Критерий F-Сох $p = ,38476$) (рисунок 33).

В группе больных колоректальным раком, не получавших предоперационную лучевую терапию, также не выявлено влияния количественного высвобождения НВЛ центра опухоли на выживаемость пациентов (Критерий F-Сох $p = ,38062$) (рисунок 34).

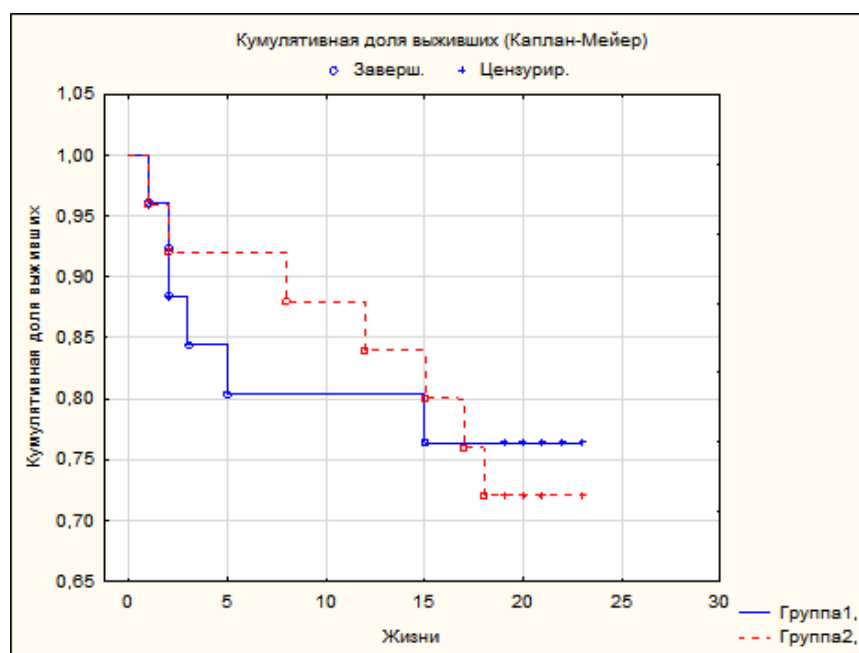


Рисунок 34 - Кумулятивная выживаемость по E. Kaplan – P. Meier у больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии (подгруппа 1- медиана тканевых НВЛ центра опухоли 0-6; подгруппа 2 – более 6)

Определена кумулятивная выживаемость у общей группы больных колоректальным раком в зависимости от количества тканевых НВЛ центра опухоли. Одногодичная выживаемость у пациентов с НВЛ менее медианы составила 82,5%, двухгодичная – 70,0%. В группе пациентов с НВЛ более медианы соответственно выживаемость составила 90,0% и 72,0%.

То есть, в общей группе больных колоректальным раком также не выявлено влияния количественного высвобождения НВЛ центра опухоли на выживаемость пациентов (Критерий F-Сох $p = ,47668$) (рисунок 35).

Таким образом, не выявлено влияния количественного высвобождения НВЛ центра опухоли на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком и независимо от проведения неoadъювантной лучевой терапии.

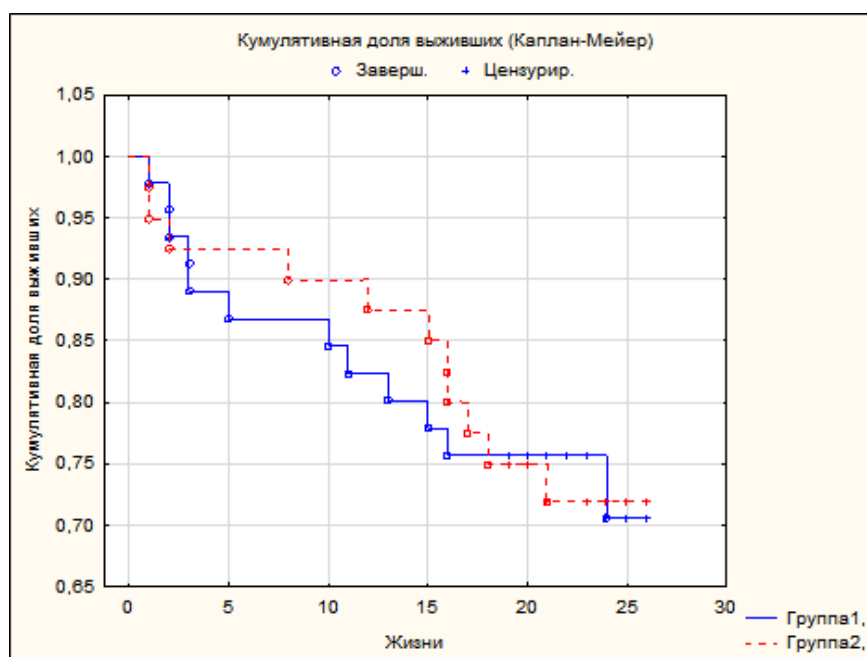


Рисунок 35 - Кумулятивная выживаемость по E. Kaplan – P. Meier в общей группе больных колоректальным раком (подгруппа 1-медиана тканевых НВЛ центра опухоли 1; подгруппа 2 –более 1)

Таким образом, выявлено выраженное количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком с и без неoadъювантной лучевой терапии до операции. В подгруппе больных с НВЛ крови ниже медианы 2-летняя выживаемость составила 64%, в подгруппе больных с НВЛ крови выше медианы – 87%. (Критерий Гехана-Вилкоксона WW $p=0,0443$. Критерий F-Сох $p=0,0156$. Крит. Кокса-Ментела $p=0,0484$. Лог-Рангов $p=0,0478$).

Аналогичную картину получили при определении влияния НВЛ крови на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком после операции. Статистически значимо количественное влияние НВЛ крови на выживаемость, она выше у пациентов с НВЛ крови выше медианы. (Критерий F-Сох $p=0,0158$. Крит. Кокса-Ментела $p=0,0493$. Критерий Вилкоксона-Пето $p=0,0489$. Лог-Рангов $p=0,0485$).

Получили статистически значимое количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в группе больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии до и после операции. До операции в подгруппе больных с НВЛ крови ниже медианы 2-летняя выживаемость составила 63%, в подгруппе больных с НВЛ крови выше медианы – 88% (Критерий F-Сох $p=0,0196$). После операции в подгруппе больных с НВЛ крови ниже медианы 2-летняя выживаемость составила 62%, в подгруппе больных с НВЛ крови выше медианы – 84% (Критерий F-Сох $p=0,0220$).

Также выявлено статистически значимое количественное влияние тканевых НВЛ периферии опухоли на выживаемость больных колоректальным раком. Выживаемость выше у пациентов с большим высвобождением тканевых

НВЛ периферии опухоли (Критерий Гехана-Вилкоксона WW $p=0,03089$. Критерий F-Сох $p=0,03163$. Критерий Вилкоксона-Пето WW $p=0,04146$).

Количественное высвобождение тканевых НВЛ центра опухоли и здоровой ткани вокруг опухоли не оказывают влияния на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком, в группах с и без неoadъювантной лучевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На базе КГП «Областной онкологический диспансер» г. Караганды подверглись исследованию 323 пациента за 2018-2020гг. Из них у 97 больных определялся НВЛ, которые все были подвергнуты оперативному вмешательству и разделены на 2 группы: 1 группа пациенты после неoadъювантного лучевого лечения ($n=37$), 2 группа без лучевого лечения ($n=60$).

Всем пациентам, включенным в исследование, производили забор проб крови на определение НВЛ до и на 7-10 сутки после операции. Кроме того, сразу после операции готовили мазки-отпечатки с рассеченной по центру опухоли, периферии опухоли и здоровой ткани в послеоперационном материале на предметных стеклах.

Выявлено изменение поведения нейтрофилов крови, их статистически значимое увеличение после операции независимо от проведения неoadъювантной лучевой терапии. Нейтрофилы крови имеют прямую корреляцию с лейкоцитами и сегментоядерными нейтрофилами до и после операции независимо от того, было ли проведено неoadъювантное лучевое воздействие.

Средний показатель НВЛ крови у больных колоректальным раком в группе с неoadъювантной лучевой терапией перед операцией ($7,91 \pm 1,61$) был выше, чем таковой у пациентов без лучевой терапии ($5,81 \pm 1,05$), но разница не значима. Средний показатель НВЛ крови после операции выравнивается в обеих группах ($9,49 \pm 2,10$ и $9,38 \pm 1,41$, соответственно), что связано, вероятнее всего, с удалением опухоли.

В общей группе больных колоректальным раком в крови наблюдается статистически значимое увеличение НВЛ с $6,56 \pm 8,80$ до операции до $9,41 \pm 11,64$ после операции ($p \leq 0,05$). Аналогичная картина наблюдается в группе пациентов без неoadъювантной лучевой терапии: рост НВЛ с $5,81 \pm 8,37$ до операции до $9,38 \pm 11,28$ после операции ($p \leq 0,05$). В группе пациентов, получавших неoadъювантную лучевую терапию, имеет место только тенденция к увеличению НВЛ в крови после операции ($p \geq 0,05$).

Медианный показатель НВЛ крови у больных колоректальным раком в сравниваемых группах первой стадии после операции в группе без неoadъювантной лучевой терапии выше, чем в группе с лучевой терапией ($\chi^2=5,6565$, $p=0,0174$). При 2, 3 и 4 стадиях различий медианных показателей НВЛ крови между группами больных колоректальным раком с лучевой терапией и без нее не выявлено.

При проведении корреляции по Пирсону у всех пациентов колоректальным раком не выявлено связи до и после операции между НВЛ крови и глубиной инвазии опухоли и степенью морфологической дифференцировки рака ($r_p = -0,05$ и $r_p = 0,03$; $p \geq 0,05$). Но в группе больных колоректальным раком с неoadъювантной лучевой терапией НВЛ крови после операции имели прямую корреляцию по Спирмену со степенью морфологической дифференцировки опухоли ($r_p=0,39$; $p \leq 0,05$).

В группе больных колоректальным раком с неоадьювантной лучевой терапией НВЛ крови после операции имели прямую корреляцию по Пирсону с палочкоядерными нейтрофилами ($r_p=0,34$; $p\leq 0,05$) после операции. НВЛ крови до операции имели обратную корреляцию по Спирмену с палочкоядерными нейтрофилами до операции ($r_p=-0,42$; $p\leq 0,05$) и прямую корреляцию с сегментоядерными нейтрофилами после операции ($r_p=0,36$; $p\leq 0,05$). НВЛ крови после операции имели прямую корреляцию по Спирмену с нейтрофилами ($r_p=0,33$; $p\leq 0,05$) и лейкоцитами после операции ($r_p=0,36$; $p\leq 0,05$).

В группе больных колоректальным раком без неоадьювантной лучевой терапии НВЛ крови до операции имели обратную корреляцию по Пирсону с нейтрофилами ($r_p=-0,26$; $p\leq 0,05$) и лейкоцитами после операции ($r_p=-0,28$; $p\leq 0,05$). НВЛ крови до операции имели обратную корреляцию по Спирмену с нейтрофилами ($r_p=-0,28$; $p\leq 0,05$) и лейкоцитами после операции ($r_p=-0,29$; $p\leq 0,05$). НВЛ крови после операции имели обратную корреляцию по Спирмену с палочкоядерными нейтрофилами после операции ($r_p=-0,25$; $p\leq 0,05$).

У всех больных колоректальным раком одинаковое освобождение НВЛ наблюдали с центра и периферии опухоли ($10,86\pm 1,03$, $10,72\pm 1,16$, соответственно; $p\geq 0,05$), в окружающих опухоль здоровых тканях единичные НВЛ ($3,14\pm 0,61$). Количественное различие НВЛ в центре и по периферии опухоли невыраженные и статистически незначимы, но различие НВЛ с ткани опухоли и здоровых тканей статистически различимы ($p\leq 0,05$).

Показатели НВЛ с центра опухоли несколько выше в группе пациентов с неоадьювантной лучевой терапией ($13,03\pm 1,53$) по сравнению без нее ($9,67\pm 1,34$), что, видимо, связано с проводимой лучевой терапией, но разница статистически не значима. А показатели НВЛ с периферии опухоли одинаковы между собой ($10,46\pm 1,81$ и $10,86\pm 1,51$, соответственно).

Показатели НВЛ со здоровой ткани имеют низкие срединные значения ($3,97\pm 1,32$ и $2,69\pm 0,59$, соответственно) и статистически значимо отличаются от показателей НВЛ с центра и периферии опухоли в обеих группах больных.

Медианный показатель НВЛ в здоровой ткани у больных колоректальным раком при первой стадии в группе без неоадьювантной лучевой терапией равен нулю, в группе с лучевой терапией медианный показатель = 4,0 (3,0; 5,5). Разница статистически значима, медианный тест, $\chi^2=5,0000$, $p=0,0253$. В группе больных без лучевой терапии при 1, 2, 3 стадиях нет высвобождения НВЛ со здоровой ткани, что, видимо, все-таки связано с отсутствием воздействия лучевой терапии. При 2, 3 и 4 стадиях не выявлено никакой закономерности освобождения НВЛ в центре и по периферии опухоли у больных с и без неоадьювантного лечения.

При проведении корреляции по Пирсону НВЛ центра опухоли у всех пациентов имели зависимость прямого вида с НВЛ периферии опухоли ($r_p=0,39$; $p\leq 0,05$) и НВЛ здоровой ткани ($r_p=0,297$; $p\leq 0,05$). НВЛ периферии опухоли имели зависимость обратного типа с нейтрофилами крови ($r_p=-0,21$;

$p \leq 0,05$) и сегментоядерными лимфоцитами до операции ($r_p = -0,25$; $p \leq 0,05$). НВЛ здоровой ткани прямо коррелировали со степенью морфологической дифференцировки рака ($r_p = 0,21$; $p \leq 0,05$).

Выявлено выраженное количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком с и без неoadъювантной лучевой терапии до операции. В подгруппе больных с НВЛ крови ниже медианы 2-летняя выживаемость составила 64%, в подгруппе больных с НВЛ крови выше медианы – 87%. (Критерий Гехана-Вилкоксона WW $p = 0,0443$. Критерий F-Сох $p = 0,0156$. Крит. Кокса-Ментела $p = 0,0484$. Лог-Рангов. Критерий $p = 0,0478$).

Аналогичную картину получили при определении влияния НВЛ крови на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком после операции. Статистически значимо количественное влияние НВЛ крови на выживаемость, она выше у пациентов с НВЛ крови выше медианы. (Критерий F-Сох $p = 0,0158$. Крит. Кокса-Ментела $p = 0,0493$. Критерий Вилкоксона-Пето $p = 0,0489$. Лог-Рангов $p = 0,0485$).

Получили статистически значимое количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в группе больных колоректальным раком без неoadъювантной лучевой терапии до и после операции. До операции в подгруппе больных с НВЛ крови ниже медианы 2-летняя выживаемость составила 63%, в подгруппе больных с НВЛ крови выше медианы – 88% (Критерий F-Сох $p = 0,0196$). После операции в подгруппе больных с НВЛ крови ниже медианы 2-летняя выживаемость составила 62%, в подгруппе больных с НВЛ крови выше медианы – 84% (Критерий F-Сох $p = 0,0220$).

Также выявлено статистически значимое количественное влияние тканевых НВЛ периферии опухоли на выживаемость больных колоректальным раком. Выживаемость выше у пациентов с большим высвобождением тканевых НВЛ периферии опухоли (Критерий Гехана-Вилкоксона WW $p = 0,0309$. Критерий F-Сох $p = 0,0316$. Критерий Вилкоксона-Пето WW $p = 0,0415$).

Количественное высвобождение тканевых НВЛ центра опухоли и здоровой ткани вокруг опухоли не оказывают влияния на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком, в группах с и без неoadъювантной лучевой терапии.

На основании вышеизложенного сделаны следующие **выводы**:

1. В общей группе больных колоректальным раком в крови наблюдается статистически значимое увеличение НВЛ с $6,56 \pm 8,80$ до операции до $9,41 \pm 11,64$ после операции ($p \leq 0,05$). Аналогичная картина наблюдается в группе пациентов без неoadъювантной лучевой терапии: рост НВЛ с $5,81 \pm 8,37$ до операции до $9,38 \pm 11,28$ после операции ($p \leq 0,05$).

2. У всех больных колоректальным раком одинаковое освобождение НВЛ с центра и периферии опухоли ($10,86 \pm 1,03$, $10,72 \pm 1,16$, соответственно; $p \geq 0,05$), в окружающих здоровых тканях опухоли единичные НВЛ ($3,14 \pm 0,61$). Количественное различие НВЛ с ткани опухоли и здоровых тканей статистически различимы ($p \leq 0,05$). Проведение неoadъювантной лучевой

терапии способствует высвобождению только НВЛ здоровой ткани вокруг опухоли ($\chi^2=5,0000$, $p=0,0253$).

3. Образование НВЛ крови у больных колоректальным раком при первой стадии после операции в группе без неоадьювантной лучевой терапии выше, чем в группе с лучевой терапией ($\chi^2=5,6565$, $p=0,0174$). При 2, 3 и 4 стадиях различий медианных показателей НВЛ крови между группами больных колоректальным раком с лучевой терапией и без нее не выявлено.

В группе больных колоректальным раком с неоадьювантной лучевой терапией НВЛ крови после операции имели прямую корреляцию по Спирмену со степенью морфологической дифференцировки опухоли ($r_p=0,39$; $p\leq 0,05$).

При проведении корреляции по Пирсону НВЛ центра опухоли у всех пациентов имели зависимость прямого вида с НВЛ периферии опухоли ($r_p=0,39$; $p\leq 0,05$) и НВЛ здоровой ткани ($r_p=0,297$; $p\leq 0,05$). НВЛ здоровой ткани прямо коррелировали со степенью морфологической дифференцировки рака ($r_p=0,21$; $p\leq 0,05$).

4. Имеет место количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком с и без неоадьювантной лучевой терапии до операции (WW $p=0,0443$, F-Сох $p=0,0156$, Кокса-Ментела $p=0,0484$, Лог-Рангов $p=0,0478$) и после операции (F-Сох $p=0,0158$, Кокса-Ментела $p=0,0493$, Вилкоксона-Пето $p=0,0489$, Лог-Рангов $p=0,0485$). Статистически значимое количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в группе больных колоректальным раком без неоадьювантной лучевой терапии до (F-Сох $p=0,0196$) и после операции (F-Сох $p=0,0220$).

Выявлено статистически значимое количественное влияние тканевых НВЛ периферии опухоли на выживаемость больных колоректальным раком. Выживаемость выше у пациентов с большим высвобождением тканевых НВЛ периферии опухоли (WW $p=0,0309$, F-Сох $p=0,0316$, Вилкоксона-Пето $p=0,0415$).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2018. American Cancer Society; Atlanta, Ga, USA: 2018. Available online: https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.241990534.545370199.1631367911-1774487344.1552057951#!/
2. Siegel R. L. Cancer Statistics // *CA Cancer J.Clin.* – 2017. – Vol. 67. - №1. – P. 7-30.
3. Крашенков О.П., Иваников И.О., Константинова Ю.С., Кочеткова Я.И., Крашенкова А.П., Виноградова Н.Н. Современные подходы к организации онкологической помощи больным колоректальным раком (обзор литературы) // *Доказательная гастроэнтерология.* – 2021. - 10(1). – С. 17-29. <https://doi.org/10.17116/dokgastro20211001117>
4. Қайдарова Д.Р., Душимова З.Д., Шатковская О.В., Онгарбаев Б.Т., Сейсенбаева Г.Т., Ажмагамбетова А.Е., Жылкайдарова А.Ж., Лаврентьева И.К., Саги М.С. Қазақстан Республикасы онкологиялық қызметінің 2020 жылғы көрсеткіштері: Статистикалық және талдау мәліметтері / – Алматы: «ҚазОжРҒЗИ» АҚ. - 2021. – 366 б.
5. Кузикеєв М. А. Эпидемиологические аспекты и оптимизация комплексного лечения рака прямой кишки в Казахстане: Автореф. дис. ...д-рамед. наук.– Бишкек, 2013. – 36 с.
6. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science.* – 2004. - Vol. 303. - №5663. – P. 1532–1535.
7. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs // *Nat Rev Microbiol.* – 2007. – 5. – P. 577-582
8. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов // М. – 2009
9. Richardson J.J.R., Hendrickse C., Gao-Smith F., Thickett D.R. Neutrophil extracellular trap production in patients with colorectal cancer in vitro // *Int J Inflam.* – 2017. doi: 10.1155/2017/4915062
10. Sorensen O.E., Borregaard N. Neutrophil Extracellular Traps - the Dark Side of Neutrophils. // *J Clin Invest.* – 2016. – 126. – P.1612–20. doi: 10.1172/JCI84538.
11. Fomenko Y., Kolesnikova Y., Beynikova I., Muravlyova L., Sirota V., Bakirova R. Influence of Combined Therapy on Generation of Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Cervical Cancer // *Open Access Maced J Med Sci.* – 2018. - 6(11). – P. 2097–2100. doi: 10.3889/oamjms.2018.483
12. Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abu Abed U., Zychlinsky A. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting // *Front. Immunol* – 2013. - Vol 4. – 48. - P. 1 – 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00048>
13. Zhang Y., Hu Y., Ma C., Sun H. et al. Diagnostic, Therapeutic Predictive, and Prognostic Value of Neutrophil Extracellular Traps in Patients With Gastric Adenocarcinoma // *Front. Oncol.* – 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01036>

14. Oklu R., Sheth R.A., Wong K.H.K., Jahromi A.H., Albadawi H. Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis // *Cardiovasc Diagn Ther.* – 2017. – 7. – P. 140–9. doi: 10.21037/cdt.2017.08.01
15. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: *WHO Classification of Tumours of the Digestive System* // Lyon: IARC Press. – 2010. – P.134-46.
16. Bujanda L. Malignant colorectal polyps // *World J.Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16. - №25. – P. 3103-3111.
17. Avksentyeva M. Colorectal cancer in Russia // *The European Journal of Health Economics.* – 2010. – Vol. 10. –P. 91.
18. Siegel K. L. Cancer statistics // *CA Cancer J.Clin.* –2015. – Vol. 65. - №1. –P. 5-29.
19. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J Clin.* – 2018. -№ 68. – P. 394–424.
20. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
21. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021 // *CA Cancer J Clin.* – 2021. - Vol 71. P. 7-33.
22. Sung J.Jy. Increasing Trend in Young- Onset Colorectal Cancer in Asia: More Cancers in Men and More Rectal Cancers // *Am. J.Gastroenterol.* – 2019. – Vol. 114 - №2. – P. 322-329.
23. Holowatyj AN, Lewis MA, Pannier ST, et al. Clinicopathologic and Racial/Ethnic Differences of Colorectal Cancer Among Adolescents and Young Adults // *Clin Transl Gastroenterol.* – 2019. - Vol 10(7):e00059. doi:10.14309/ctg.0000000000000059
24. Chatenoud L. Trends in mortality from major cancers in the Americas: 1980-2010 // *Ann.Oncol.* – 2014. – Vol. 25. - №9. – P. 1843-1853.
25. Malvezzi M. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer // *Ann.Oncol.* – 2018. – Vol. 29. - №4. – P. 1016-1022.
26. Ghoncheh et al. Colorectal Cancer and Human Development Index in Asia // *Annals of Global Health.* – 2016. - Vol. 82. - №5. - P. 726 – 737.
27. Dolatkhah R. Colorectal cancer in Iran: molecular epidemiology and screening strategies // *J.Cancer Epidemiol.* – 2015.–Vol. 16. – P. 27-32.
28. Torre L. A. Global cancer statistics // *CA Cancer J.Clin.* – 2015. – Vol. 65. – P. 87-108.
29. Andrew R. Epidemiology of colorectal cancer // *Int. J. Mol.Epidemiol. Genet.* – 2016. – Vol. 7. - №3. – P. 105-114.
30. Федоров В.Э., Поделякин К.А. Эпидемиологические аспекты колоректального рака (обзор) // *Медицинский альманах.* - 2017. - № 4 (49). – С. 145-148.

31. Rebecca L. Where Can Colorectal Cancer Screening Interventions Have the Most Impact? // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. – 2015. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15 0082.
32. De Rosa M, Pace U, Rega D, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review) // *Oncol Rep.* – 2015. – 34. – P. 1087–96
33. Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome // *JAMA*. – 2011. – 305. – P. 2304–10.
34. Prashanth Rawla, Tagore Sunkara, Adam Barsouk. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors // *Prz Gastroenterol*. – 2019. – 14(2). – P. 89–103. doi: 10.5114/pg.2018.81072.
35. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates // *Cancer*. – 2010. – 116. – P. 544–73.
36. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality // *Gut*. – 2017. – 66. – P.683–91.
37. Қайдарова Д.Р., Балтабеков Н.Т., Душимова З.Д., Шатковская О.В. Қазақстан Республикасы онкологиялық қызметінің 2019 жылғы көрсеткіштері: Статистикалық және талдау мәліметтері / және басқалар – Алматы, 2020. - 226 б.
38. Ахметова З. Д., Жаксалыкова Г.Б., Шайхиев С.С. және басқалар. 2019 жылда Қазақстан Республикасы халқының денсаулығы және денсаулық Е40 сақтау ұйымдарының қызметі: Стат. жинақ. - 2020. - С. 274-277.
39. Турбекова М.Н., Камхен В.Б. Региональные особенности эпидемиологии колоректального рака в Казахстане // *Международный журнал экспериментального образования*. – 2015. – № 11-1. – С. 52-53; URL: <https://expeducation.ru/ru/article/view?id=8297>
40. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: Is Immunity the Second Function of Chromatin? // *J Cell Biol* – 2012. – 198. – P. 773–83. doi:10.1083/jcb.201203170.
41. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET Formation by Gene Therapy in CGD Controls Aspergillosis // *Blood*. – 2009. – 114. – P. 2619–22. doi:10.1182/blood-2009-05-221606.
42. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils Sense Microbe Size and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps in Response to Large Pathogens // *Nat Immunol*. – 2014. – 15. P. 1017–25. doi:10.1038/ni.2987.
43. Erpenbeck L., Schön M. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? // *Oncogene*. – 2017. – 36. – P. 2483–2490. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.406>
44. Gerrard T. L., Cohen D. J., Kaplan A. M. Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1981. – Vol. 66. – №3. – P. 483–488.

45. Katano M., Torisu M. Neutrophil-mediated tumor cell destruction in cancer ascites // *Cancer*. – 1982. - Vol. 50. - №1. - P. 62–68.
46. Uribe-Querol E., Rosales C. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin // *Journal of Immunology Research*. – 2015. - Vol.2015. - Article ID 983698. – P. 21. <https://doi.org/10.1155/2015/983698>
47. Cooper P. R., Palmer L. J., Chapple L. C. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? // *Periodontology*. – 2013. - Vol. 63. - №1. – P. 165–197.
48. Fulda S. Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2014. - Vol. 818. – P. 167–180.
49. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade // *J Innate Immun*. – 2018. – 10. – P.414-21.
50. Bonaventura A., Vecchie A., Abbate A., Montecucco F. Neutrophil Extracellular Traps and Cardiovascular Diseases: An Update // *Cells*. – 2020. – 9. – P. 231. doi:10.3390/cells9010231
51. Fousert E., Toes R., Desai J. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses // *Cells*. – 2020. – 9. – P.915. doi:10.3390/cells9040915
52. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death Differ*. – 2018. – 25. – P. 486–541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
53. Sollberger G., Tilley D.O., Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization // *Dev Cell*. – 2018. – 44. – P.542–53. doi:10.1016/j.devcel.2018.01.019
54. Arroyo R., Khan M.A., Echaide M., Perez-Gil J., Palaniyar N. SP-D Attenuates LPS-Induced Formation of Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs), Protecting Pulmonary Surfactant Inactivation by NETs // *Commun Biol*. – 2019. – 2. – P. 470. doi:10.1038/s42003-019-0662-5
55. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., et al. Platelet TLR4 Activates Neutrophil Extracellular Traps to Ensnare Bacteria in Septic Blood // *Nat Med*. – 2007. – 13. – P. 463–9. doi:10.1038/nm1565
56. An Z., Li J., Yu J., Wang X., Gao H., Zhang W., et al. Neutrophil Extracellular Traps Induced by IL-8 Aggravate Atherosclerosis *via* Activation NF-kappa B Signaling in Macrophages // *Cell Cycle* – 2019. – 18. – P.2928–38. doi:10.1080/15384101.2019.1662678
57. Colon D.F., Wanderley C.W., Franchin M., Silva C.M., Hiroki C.H., Castanheira F.V.S., et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Exacerbate Severity of Infant Sepsis // *Crit Care*. – 2019. – 23. – P. 113. doi:10.1186/s13054-019-2407-8
58. Boeltz S., Amini P., Anders H.J., Andrade F., Bilyy R., Chatfield S., et al. To NET or Not to NET:current Opinions and State of the Science Regarding the Formation of Neutrophil Extracellular Traps // *Cell Death Differ* – 2019. – 26. – P.395–408. doi:10.1038/s41418-018-0261-x

59. Li T., Wang C., Liu Y., Li B., Zhang W., Wang L., et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Intestinal Damage and Thrombotic Tendency in Inflammatory Bowel Disease // *J Crohns Colitis*.- 2020. – 14. – P. 240–53. doi:10.1093/ecco-jcc/jjz132
60. Kubiritova Z., Radvanszky J., Gardlik R. Cell-Free Nucleic Acids and Their Emerging Role in the Pathogenesis and Clinical Management of Inflammatory Bowel Disease // *Int J Mol Sci* – 2019. – 20. – P. 3662. doi:10.3390/ijms20153662
61. Gottlieb Y., Elhasid R., Berger-Achituv S., Brazowski E., Yerushalmy-Feler A., Cohen S. Neutrophil Extracellular Traps in Pediatric Inflammatory Bowel Disease // *Pathol Int* – 2018. – 68. – P. 517–23. doi:10.1111/pin.12715
62. Manda-Handzlik A., Demkow U. The Brain Entangled: The Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to the Diseases of the Central Nervous System // *Cells* – 2019. – 8. – P.1477. doi:10.3390/cells8121477
63. Paryzhak S., Dumych T., Mahorivska I., Boichuk M., Bila G., Peshkova S., et al. Neutrophil-Released Enzymes can Influence Composition of Circulating Immune Complexes in Multiple Sclerosis // *Autoimmunity*. – 2018. – 51. –P. 297–303. doi:10.1080/08916934.2018.1514390
64. Josefs T., Barrett T.J., Brown E.J., Quezada A., Wu X., Voisin M., et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Macrophage Inflammation and Impair Atherosclerosis Resolution in Diabetic Mice // *JCI Insight*. – 2020. – 5. - e134796. doi: 10.1172/jci.insight.134796
65. Doring Y., Libby P., Soehnlein O. Neutrophil Extracellular Traps Participate in Cardiovascular Diseases: Recent Experimental and Clinical Insights // *Circ Res*. – 2020. – 126. – P. 1228–41. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315931
66. Ducroux C., Di Meglio L., Loyau S., Delbosc S., Boisseau W., Deschildre C., et al. Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke // *Stroke*. – 2018. – 49. – P. 754–57. doi:10.1161/STROKEAHA.117.019896
67. Lee K.H., Kronbichler A., Park D.D., Park Y., Moon H., Kim H., et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review // *Autoimmun Rev*. – 2017. – 16. – P. 1160–73. doi:10.1016/j.autrev.2017.09.012
68. Granger V., Peyneau M., Chollet-Martin S., de Chaisemartin L. Neutrophil Extracellular Traps in Autoimmunity and Allergy: Immune Complexes at Work // *Front Immunol*. – 2019. – 10. - P. 2824. doi:10.3389/fimmu.2019.02824
69. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю., Курносенко И.В., Долгушина В.Ф., Савельева А.А., Самусева И.В. и др. Участие внеклеточных ДНК-ловушек в защитных и патологических реакциях организма // *Российский иммунологический журнал*. – 2015. – 9. – 2. – P. 164-70.
70. Долгушин И.И., Мезенцева Е.А. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в борьбе с биопленкообразующими микроорганизмами: охотники или добыча? // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2020. - Том 97. - № 5. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-9>
71. Воробьева Н.В., Пинегин Б.В. Нейтрофильные внеклеточные

ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии (обзор) // *Biochemistry (Moscow)*. – 2014. - Том. 79. - №12. – С. 1286-1296.

72. Steinberg B. E. Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death // *Science's STKE*. – 2007. - Vol. 2007. № 379. – P. 11.

73. Yang H., Biermann M.H., Brauner J.M., Liu Y., Zhao Y., Herrmann M. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation // *Front Immunol*. – 2016. – 12. – 7. – P. 302. doi: 10.3389/fimmu.2016.00302.

74. Sørensen O.E., Borregaard N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils // *J Clin Invest*. – 2016. - 126(5). – P. 1612-20. doi: 10.1172/JCI84538.

75. Ravindran M., Khan M.A., Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology // *Biomolecules*. – 2019. - 14;9(8). – P. 365. doi: 10.3390/biom9080365.

76. Delgado-Rizo V., Martínez-Guzmán M.A., Iñiguez-Gutierrez L., García-Orozco A., Alvarado-Navarro A., Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview // *Front. Immunol*. – 2017. – 8. – P. 81. doi: 10.3389/fimmu.2017.00081

77. Pilsczek F.H., Salina D., Poon K.K., Fahey C., Yipp B.G., Sibley C.D., et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus* // *J Immunol*. – 2015. – 185. – P. 7413–25. doi:10.4049/jimmunol.1000675

78. Branitzki-Heinemann K., Möllerherm H., Völlger L., Husein D.M., de Buhr N., Blodkamp S., et al. Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level // *Front Immunol*. – 2016. – 7. - P. 518. doi:10.3389/fimmu.2016.00518

79. Douda D.N., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2015. – 112. – P. 2817–22. doi:10.1073/pnas.1414055112

80. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? // *Blood*. – 2013. – 122. – P.2784–94. doi:10.1182/blood-2013-04-457671

81. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E., Schmid I., Simon H.U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps // *Cell Death Differ*. – 2009. – 16. – P. 1438–44. doi:10.1038/cdd.2009.96

82. Wang, H., Li, T., Chen, S., Gu, Y., Ye S. Neutrophil extracellular trap mitochondrial DNA and its autoantibody in systemic lupus erythematosus and a proof-of-concept trial of Metformin // *Arthritis Rheumatol*. – 2015. – 67. – P. 3190–3200.

83. Neeli I., Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release // *Front. Immunol*. – 2013. – 4. – P. 38.

84. Smith C. K., Kaplan M. J. The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus // *Curr. Opin. Rheumatol*. – 2015. – 27. – P. 448–453.

85. Garcia-Romo G. S. et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus // *Sci. Transl. Med.* – 2011. – 3. – P.73.
86. Dworski R., Simon H. U., Hoskins A., Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2011. – 127. – P. 1260–1266.
87. Uddin M., Watz H., Malmgren A., Pedersen F. NETopathic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and severe asthma // *Front. Immunol.* – 2019. – 10. – P. 47.
88. Moodley M., Moodley J., Naicker T. The Role of Neutrophils and Their Extracellular Traps in the Synergy of Pre-eclampsia and HIV Infection // *Curr Hypertens Rep.* – 2020. – 22. – P. 41. <https://doi.org/10.1007/s11906-020-01047-z>
89. Kimball A.S., Obi A.T., Diaz J.A., Henke P.K. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis // *Front Immunol.* – 2016. – 27. – 7. – P. 236. doi: 10.3389/fimmu.2016.00236.
90. Che, Q.; Zhang L.; Li X.; Zhuo W. Neutrophil Extracellular Traps in Tumor Metastasis: Pathological Functions and Clinical Applications // *Cancers.* – 2021. – 13. – P. 2832. <https://doi.org/10.3390/cancers13112832>
91. Fuchs TA, Abed U., Goosmann C., et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps // *J Cell Biol.* – 2007. - 176(2). – P. 231–241. doi: 10.1083/jcb.200606027.
92. Дядичкина О. В., Коротина О. Л., Радецкая Л. Е., Генералов И. И. Возможности люминесцентной и световой микроскопии при определении внеклеточных нейтрофильных ловушек // *Вестник ВГМУ.* - 2014. - №5. <https://cyberleninka.ru/article/n/vozmozhnosti-lyuminestsentnoy-i-svetovoy-mikroskopii-pri-opredelenii-vnekletochnyh-neytrofilnyh-lovushek>
93. Wardini A.B., Guimaraes-Costa A.B., Nascimento M.T., Nadaes N.R., Danelli M.G., Mazur C, et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus // *J Gen Virol.* – 2010. – 91. - P. 259–64
94. Robb C.T., Dyrinda E.A., Gray R.D., Rossi A.G., Smith V.J. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon // *Nat Commun.* – 2014. – 5. – P. 4627.
95. Zhang X., Zhuchenko O., Kuspa A., Soldati T. Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets // *Nat Commun.* – 2016. – 7. – P. 10938.
96. Cichon I., Santocki M., Ortmann W., Kolaczowska E. Imaging of Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps (NETs) with Intravital (In Vivo) Microscopy. In: Quinn M., DeLeo F. (eds) *Neutrophil // Methods in Molecular Biology.* – 2020. - Vol 2087. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0154-9_26
97. Sultan Z. Alasmari. In Vivo Imaging of Neutrophil Extracellular Traps (NETs): Visualization Methods and Outcomes // *BioMed Research International.* – 2020. - Vol. 2020. - Article ID 4192745. – P. 6. <https://doi.org/10.1155/2020/4192745>
98. de Buhr N., von Köckritz-Blickwede M. Detection, Visualization, and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and NET Markers. In:

Quinn M., DeLeo F. (eds) Neutrophil // Methods in Molecular Biology. – 2020. – Vol. 2087. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0154-9_25

99. Healy L.D., Puy C., Itakura A., Chu T., Robinson D.K., Bylund A., Phillips K.G., Gardiner E.E., McCarty O.J. Colocalization of neutrophils, extracellular DNA and coagulation factors during NETosis: Development and utility of an immunofluorescence-based microscopy platform // J Immunol Methods. – 2016.- 435. – P. 77-84. doi: 10.1016/j.jim.2016.06.002.

100. Tong M., Abrahams V.M. Visualization and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps. In: Alvero A.B., Mor G.G. (eds) Detection of Cell Death Mechanisms // Methods in Molecular Biology. – 2021.- Vol. 2255. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1162-3_9

101. von Köckritz-Blickwede M., Chow O., Ghochani M., Nizet V. Visualization and functional evaluation of phagocyte extracellular traps // Methods in Microbiology C. – 2010. – 37. – P. 139–160.

102. Völlger L., von Köckritz-Blickwede M. Neutrophil extracellular trap formation: a single cell event? // Single Cell Biology. – 2015. – 4. – 4. – P.125. doi:10.4172/2168-9431.1000125

103. Neumann A., Völlger L., Berends E.T.M., et al. Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases // Journal of Innate Immunity. – 2014. – 6. – 6. – P.860–868. doi:10.1159/000363699

104. Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, методы обнаружения, биологическая роль дис. ... докт. мед. наук: 14.03.19: защищена 10.02.2012: утв. 25.05.12 / Савочкина Альбина Юрьевна. - Челябинск- 2012. - 222 с. - Библиогр.: С.202-213. - 005011509

105. Басырева Л. Ю., Михальчик Е. В., Тихазе А. К., Гусев С. А., Ланкин В. З., Панасенко О. М. Образование нейтрофильных внеклеточных ловушек в цельной крови под действием липопротеинов низкой плотности, модифицированных в условиях, моделирующих галогенирующий и карбонильный стресс // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2020. - Т. 37. - № 3. – С. 188-196.

106. Бедина С.А., Трофименко А.С., Мамус М.А., Тихомирова Е.А., Мозговая Е.Э., Спицина С.С., Девятаева Н.М. Образование внеклеточных ловушек нейтрофилов у больных ревматоидным артритом // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 2. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29587>.

107. Бейникова И.В., Нургалиева А.С., Демидчик Л.А., Хендриксон В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки пациентов с хронической болезнью почек различных стадий // Вестник АГИУВ. – 2016. - №3. – С.29-32.

108. Molotov-Luchanskiy V., Nukhuly A., Muravlyova L., Bakirova R., Kossybayeva A., Klyuyev D., Demidchik L., Beinikova I. Neutrophil Oxidized-Modified Proteins and Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Community-Acquired Pneumonia // Pulmonary Medicine. – 2020. – Vol. 2020. - Article ID4897038. – P. 5. <https://doi.org/10.1155/2020/4897038>

109. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., Gowing S., Chow S., Giannias B., Bourdeau F., Kubes P., Ferri L. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis // *J Clin Invest* – 2013. – 123(8). – P. 3446–58. doi: 10.1172/JCI67484.
110. Палладина А.Д., Хомякова Н.Ф. Нетоз как механизм прогрессирования рака // *Иммунология гемопоеза*. – 2019. – №2. – С. 39-53.
111. Ronchetti, L., Boubaker, N.S., Barba, M. et al. Neutrophil extracellular traps in cancer: not only catching microbes // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2021. – 40. – P.231. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02036-z>
112. Shao B.Z., Yao Y., Li J.P., Chai N.L, Linghu E.Q. The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Cancer // *Front. Oncol*. – 2021. – 11. - 714357. doi: 10.3389/fonc.2021.714357
113. Demers M., Krause D.S., Schatzberg D., Martinod K., Voorhees J.R., Fuchs T.A., et al. Cancers Predispose Neutrophils to Release Extracellular DNA Traps That Contribute to Cancer-Associated Thrombosis // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2012. – 109. – P.13076–81. doi:10.1073/pnas.1200419109
114. Albregues J., Shields M.A., Ng D., Park C.G., Ambrico A., Poindexter M.E., et al. Neutrophil Extracellular Traps Produced During Inflammation Awaken Dormant Cancer Cells in Mice // *Science*. – 2018. – P. 361. doi:10.1126/science.aao4227
115. Houghton A.M., Rzymkiewicz D.M., Ji H., Gregory A.D., Egea E.E., Metz H.E., et al. Neutrophil Elastase-Mediated Degradation of IRS-1 Accelerates Lung Tumor Growth // *Nat Med*. – 2010. – 16. – P.219–23. doi:10.1038/nm.2084
116. Sangaletti S., Tripodo C., Vitali C., Portararo P., Guarnotta C., Casalini P., Cappetti B., Miotti S., Pinciroli P., Fuligni F., Fais F., Piccaluga P.P., Colombo M.P. Defective stromal remodeling and neutrophil extracellular traps in lymphoid tissues favor the transition from autoimmunity to lymphoma // *Cancer Discov*. – 2014. – 4(1). – P. 110-29. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0276.
117. Decker A.S., Pylaeva E., Brenzel A., Spyra I., Droege F., Hussain T, Lang S., Jablonska J. Prognostic Role of Blood NETosis in the Progression of Head and Neck Cancer // *Cells*. – 2019. – 8(9). – P. 946. doi:10.3390/cells8090946
118. Snoderly, H.T., Boone, B.A., Bennewitz, M.F. Neutrophil extracellular traps in breast cancer and beyond: current perspectives on NET stimuli, thrombosis and metastasis, and clinical utility for diagnosis and treatment // *Breast Cancer Res*. – 2019. – 21. – P.145. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1237-6>
119. Schedel F., Mayer-Hain S., Pappelbaum K.I., Metze D., Stock M., Goerge T., Loser K., Sunderkötter C., Luger T.A., Weishaupt C. Evidence and impact of neutrophil extracellular traps in malignant melanoma // *Pigment Cell Melanoma Res*. – 2020. – 33(1). – P.63-73. doi: 10.1111/pcmr.12818.
120. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: 'N1' versus 'N2' TAN // *Cancer Cell*. – 2009. – 16. – P.183–194.
121. Houghton A.M. The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances // *Cell Cycle*. – 2014. – 9. – P.1732–1737.

122. An H., Zhu Y., Xie H., Liu Y., Liu W., Fu Q et al. Increased expression of interleukin-8 is an independent indicator of poor prognosis in clear-cell renal cell carcinoma // *Tumour Biol.* – 2015. – 37. – P.4523–4529
123. Sagiv J. Y., Michaeli J., Assi S., et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer // *Cell reports.* – 2015. – 10(4). – P. 562–73. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.12.039
124. Rakic A., Beaudry P., Mahoney D.J. The complex interplay between neutrophils and cancer // *Cell Tissue Res.* – 2018. – 371. – P. 517–529. doi:10.1007/s00441-017-2777-7
125. Michaeli J., Shaul M.E., Mishalian I., Hovav A. H., Levy L., Zolotriov L., Granot Z., Fridlender Z.G. Tumor-associated neutrophils induce apoptosis of non-activated CD8 T-cells in a TNF α and NO-dependent mechanism, promoting a tumor-supportive environment // *OncoImmunology.* – 2017. – 6. doi:10.1080/2162402X.2017.1356965
126. Wang T., Zhao Y., Peng L., Chen N., Chen W., Lv Y., Mao F., Zhang J., Cheng P., Teng Y., et al. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway // *Gut.* – 2017. – 66. – P. 1900–1911. doi:10.1136/gutjnl-2016-313075
127. Hsu B.E., Tabariès S., Johnson R.M., Andrzejewski S., Senecal J., Lehuédé C., Annis M.G., Ma E.H., Völs S., Ramsay L., et al. Immature Low-Density Neutrophils Exhibit Metabolic Flexibility that Facilitates Breast Cancer Liver Metastasis // *Cell Rep.* – 2019. – 27. – P.3902-3915.e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.05.091
128. Saraiva D. P., Bruna F., Correia, Salvador R., Nídia de Sousa, Jacinto A., Braga S., Cabral M.G. Circulating Low Density Neutrophils of Breast Cancer Patients are Associated with their Worse Prognosis due to the Impairment of T cell Responses // *bioRxiv.* – 2021. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.19.431986>
129. Liu Y., Liu L. The Pro-Tumor Effect and the Anti-Tumor Effect of Neutrophils Extracellular Traps // *Biosci Trends.* – 2020. – 13. – P. 469–75. doi: 10.5582/bst.2019.01326
130. Triner D., Devenport S.N., Ramakrishnan S.K., Ma X., Frieler R.A., Greenson J.K., et al. Neutrophils Restrict Tumor-Associated Microbiota to Reduce Growth and Invasion of Colon Tumors in Mice // *Gastroenterology.* – 2019. – 156. – P.1467–82. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.003
131. Levy A., Chargari C., Marabelle A., et al. Can immunostimulatory agents enhance the abscopal effect of radiotherapy? // *Eur J Cancer (Oxf Engl 1990).* – 2016. – 62. – P. 36–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.03.06>
132. Zvi G., Fridlender, Steven M., Albelda, Tumor-associated neutrophils: friend or foe? // *Carcinogenesis.* – 2012. – Vol. 33. – P. 949 –955, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs123>
133. Kargl J., Busch S.E., Yang G.H.Y., et al. Neutrophils dominate the immune cell composition in non-small cell lung cancer // *Nat Commun.* – 2017. – 8. – P. 14381 <https://doi.org/10.1038/ncomms14381>
134. Shen M., Hu P., Donskov F., Frede Donskov., Wang G., Liu Q., Du J.

Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis // PLoS One. – 2017. – 12(12). – P. 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098259>

135. Chang X., Han J., Pang L., Zhao Y., Yang Y., Shen Z.. Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors // BMC Cancer. – 2009. – 9(1). – 40. DOI: 10.1186/1471-2407-9-40

136. Yang L., Liu Q., Zhang X. et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25 // Nature. – 2020. – **583**. – P.133–138. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2394-6>

137. Roni F., Rayes., Lorenzo E., Ferri, Jonathan D. Spicer et al. Primary tumors induce neutrophil extracellular traps with targetable metastasis-promoting effects // JCI Insight. – 2019. – 4(16). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128008>.

138. Li Y., Yang Y., Gan T., Zhou J., Hu F., Hao N., et al. Extracellular RNAs from lung cancer cells activate epithelial cells and induce neutrophil extracellular traps // Int J Oncol – 2019. – 55. – P.69–80. doi: 10.3892/ijo.2019.4808

139. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment // Cancer Cell – 2012. – 21. – P.309–22. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022

140. Correia AL., Bissell M.J. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance // Drug Resist Updat. – 2012. – 15. – P. 39–49. doi: 10.1016/j.drug.2012.01.006

141. Martins-Cardoso K., Almeida V.H., Bagri K.M., Rossi M.I.D., Mermelstein C.S., Konig S., et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Promote Pro-Metastatic Phenotype in Human Breast Cancer Cells Through Epithelial-Mesenchymal Transition // Cancers (Basel). – 2020. – 12. – P.735–47. doi:10.3390/cancers12061542

142. Arpinati L., Shaul M.E., Kaisar-Iluz N., Mali S., Mahroum S., Fridlender Z.G. 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. – P. 199–213. doi:10.1007/s00262-019-02474-x

143. Campello E., Ilich A., Simioni P., Key N.S. The Relationship Between Pancreatic Cancer and Hypercoagulability: A Comprehensive Review on Epidemiological and Biological Issues // Br J Cancer. – 2019. – 121. – P. 359–71. doi:10.1038/s41416-019-0510-x

144. Rayes R.F., Vourtzoumis P., Bou Rjeily M., Seth R., Bourdeau F., Giannias B., et al. Neutrophil Extracellular Trap-Associated CEACAM1 as a Putative Therapeutic Target to Prevent Metastatic Progression of Colon Carcinoma // J Immunol. – 2020. – 204. – P. 2285–94. doi:10.4049/jimmunol.1900240

145. Fagerhol M.K., Johnson E., Tangen J.M., Hollan I., Mirlashari M.R., Nissen-Meyer L.S.H., et al. NETs Analysed by Novel Calprotectin-Based Assays in Blood Donors and Patients With Multiple Myeloma or Rheumatoid Arthritis: A Pilot Study // Scand J Immunol. – 2020. – 91. doi:10.1111/sji.12870

146. Wolach O., Sellar R.S., Martinod K., Cherpokova D., McConkey M., Chappell R.J., et al. Increased Neutrophil Extracellular Trap Formation Promotes

Thrombosis in Myeloproliferative Neoplasms // Sci Transl Med. – 2018. – 10. - 52. doi:10.1126/scitranslmed.aan8292

147. Marone G., Schroeder J.T., Mattei F., Loffredo S., Gambardella A.R., Poto R., et al. Is There a Role for Basophils in Cancer? // Front Immunol. – 2020. – 11. – P. 2103. doi: 10.3389/fimmu.2020.02103

148. Мадиева Л.С., Мамашалиева С.Б., Бакирова Р.Е., Муравлёва Л.Е., Ибраева Л.К. Некоторые аспекты патогенеза бронхиальной астмы: обзор литературы // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 2.; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29611>

149. Miller-Ocuin, J.L.; Liang, X.; Boone, B.A.; Doerfler, W.R.; Singhi, A.D.; Tang, D.; Kang, R.; Lotze, M.T.; Zeh, H.J., 3rd. DNA released from neutrophil extracellular traps (NETs) activates pancreatic stellate cells and enhances pancreatic tumor growth // Oncoimmunology. – 2019. – 8. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1605822>

150. Tohme, S.; Yazdani, H.O.; Al-Khafaji, A.B.; Chidi, A.P.; Loughran, P.; Mowen, K.; Wang, Y.; Simmons, R.L.; Huang, H.; Tsung, A. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress // Cancer Res. – 2016. – 76. – P. 1367–1380. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-15-1591

151. Jin W.; Xu, H.X.; Zhang, S.R.; Li, H.; Wang, W.Q.; Gao, H.L.; Wu, C.T.; Xu, J.Z.; Qi, Z.H.; Li, S.; et al. Tumor-Infiltrating NETs Predict Postsurgical Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma // Ann. Surg. Oncol. – **2019**. – 26. - P. 635–643. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6941-4>

152. <https://mkb-10.com/> Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра, онлайн версия.

153. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K. and Wittekind Ch. International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours, 7th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2019.

154. Способ обнаружения НВЛ: патент РФ на изобретение / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева. - № 2384844; опубли. 01.04.2008.

155. Семенова А.Б. Морфофункциональная характеристика клеточного компонента микроокружения карцином молочной железы различной степени злокачественности и молекулярно-генетических подтипов дис. ... докт. мед. наук: 14.03.02: защищена 25.06.2018: утв. 25.08.18 / Семенова Анна Борисовна. - Курган- 2018. - 230 с. - Библиогр.: С.35-56. – 007018512

156. http://labx.narod.ru/documents/okraska_po_maj_gryunvaldu.html

157. Боровиков В.П., Боровиков И. П. Statistica – статистический анализ и обработка данных в среде Windows // М.: Филинь. – 1998. – 608 с.

158. Боровиков В.П., Боровиков И.П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. - Изд. 2-е. – СПб.: Питер. – 2004. – 688 с.

[illegible]



ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акт внедрения результатов исследования в практику здравоохранения и учебный процесс

Ф КГМУ 7-06/02

ПП КГМУ 7/02

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе КГМУ
В. Б. Сирота Турмухамбетова А. А.

« 10 » 12 2021 г.

АКТ

Внедрения результатов научно-исследовательской работы

Кафедра онкологии и лучевой диагностики, отделение абдоминальной хирургии и онкохирургии МБ №3 г. Караганды

(наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: Определение нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) ткани опухоли у больных колоректальным раком до и после оперативного лечения

Форма внедрения: Определение тканевых НВЛ опухоли у больных колоректальным раком до и после оперативного лечения и количественное влияние их на выживаемость больных

Работа включена из: Предложение кафедры онкологии и лучевой терапии и кафедры биохимии НАО «МУК»

планов внедрения научно-исследовательских, учебных институтов,

внедрения в инициативном порядке, заимствована из методических рекомендаций,

журнальных статей, диссертаций, монографий – указать)

Форма внедрения: Определение тканевых НВЛ с центра, периферии опухоли и здоровой ткани у больных колоректальным раком до и после оперативного лечения и количественное влияние их на выживаемость больных

(внедрения метода, способа, аппарата в лечебно-профилактическом

учреждении, лекции, семинары, подготовки на рабочем месте и прочее – указать)

Ответственный за внедрение и исполнитель: Сирота В. Б., Муравлева Л.Е., Жумакаев А.М., Кабилова Н.А., Мараткызы М.

Эффективность внедрения: Статистически значимо только количественное влияние НВЛ периферии опухоли на выживаемость, она выше у пациентов с НВЛ периферии опухоли выше медианы (Критерий WW $p = .03089$, F-Sch $p = .03163$, Вилкоксона-Пето $p = .04146$).

Однолетняя выживаемость у пациентов с НВЛ менее медианы составила 80%, двухлетняя - 66%. В группе пациентов с НВЛ более медианы соответственно выживаемость составила 97,5% и 85%. Выживаемость выше у пациентов с большим высвобождением тканевых НВЛ периферии опухоли. Высвобождение тканевых НВЛ с центра опухоли и здоровой ткани не оказывает влияния на выживаемость больных колоректальным раком.

Предложения, замечания, учреждения, осуществляющего внедрение: Определение тканевых НВЛ периферии опухоли у больных колоректальным раком и количественное влияние их на выживаемость больных.

Сроки внедрения в течение 2018-2021 гг.

Председатель комиссии

Члены (ответственные за внедрение)

Исполнитель



М. Д. Жумакаев

Л.Е. Муравлева

В. Б. Сирота

А.М. Жумакаев

Н.А. Кабилова

М. Мараткызы

Ф КГМУ 7-06/02
III КГМУ 7/02

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе КГМУ
А. А. Турмухамбетов Турмухамбетов А. А.

« 10 » 12 2021 г.

АКТ

Внедрения результатов научно-исследовательской работы

Кафедра онкологии и лучевой диагностики, отделение абдоминальной хирургии и онкохирургии МБ №3 г. Караганды

(наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: Определение нейтрофильных спектрочных ловушек (НВЛ) крови у больных колоректальным раком до и после оперативного лечения

Форма внедрения: Определение НВЛ крови у больных колоректальным раком до и после оперативного лечения и количественное влияние их на выживаемость больных

Работа включена из: Предложение кафедры онкологии и лучевой терапии и кафедры биохимии ЦАО «МУК»

планов внедрения научно-исследовательских, учебных институтов,
внедрения в инициативном порядке, заимствования из методических рекомендаций,
журнальных статей, диссертаций, монографий - указать)

Форма внедрения: Определение НВЛ крови у больных колоректальным раком до и после оперативного лечения и количественное влияние их на выживаемость больных

(внедрения метода, способа, аппарата в лечебно-профилактическом

учреждении, лекции, семинары, подготовки на рабочем месте и прочие - указать)

Ответственный за внедрение и исполнитель: Сирота В. Б., Муравлева Л.Б., Жумакаев А.М., Кабилдина Н.А., Мараткызы М.

Эффективность внедрения: Статистически значимо количественное влияние НВЛ крови на выживаемость, она выше у пациентов с НВЛ крови выше медианы (F-Сох $p = .01580$, Кокса-Ментела $p = .04928$, Критерий Вилкоксона-Песто $p = .04890$, Лог-Рангов, Критерий $p = .04852$).

Выявлено количественное влияние НВЛ крови на выживаемость в общей группе больных колоректальным раком и в группе больных без неоперабельной лучевой терапии.

Предложения, замечания, учреждения, осуществляющего внедрение: Определение НВЛ крови у больных колоректальным раком до и после оперативного лечения и количественное влияние их на выживаемость больных.

Сроки внедрения в течение 2018-2021 гг.

Председатель комиссии

Члены (ответственные за внедрение)

Исполнитель



М. Д. Жумакаев
Л.Б. Муравлева

В. Б. Сирота
А.М. Жумакаев
Н.А. Кабилдина
М. Мараткызы