

***Ex vivo* МОДЕЛЬ ТРОМБОВОСПАЛЕНИЯ У МЫШЕЙ С ВАЛИДАЦИЕЙ
НА МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЕМТ-6**

© 2025 г. Ю. Д. Д. Коробкина¹, А. А. Мишуков¹, Е. О. Осидак²,

А. Н. Свешникова^{1,2,*}

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

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

*E-mail: asvebnikova@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.10.2024 г.

После доработки 07.11.2024 г.

Принята к публикации 07.11.2024 г.

Тромбовоспаление – это комплексное взаимодействие между системой гемостаза и иммунной системой, связанное с участием нейтрофилов в процессе тромбообразования. Дисбаланс взаимной активации тромбоцитов и нейтрофилов при различных патологиях приводит к тромбозам или кровотечениям. Ранее нами была разработана методика *ex vivo* наблюдения процесса тромбообразования и хемотаксиса нейтрофилов в плоскопараллельных проточных камерах, покрытых фибриллярным коллагеном. Целью данной работы была разработка методики *ex vivo* наблюдения процесса тромбовоспаления у мышей, позволяющая анализировать взаимодействие полиморфоядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) с растущими тромбами. Для валидации методики использовалась модель рака молочной железы у мышей линии BALB/c (7 дней после ортотопической инокуляции культурой опухолевых клеток ЕМТ-6). В образцах крови здоровых мышей на фибриллярном коллагене образовывались полноценные тромбы, однако ядерные клетки не наблюдались. Использование комбинации фибронектина и коллагена в качестве подложки позволило индуцировать тромбообразование и отслеживать движение и поведение ПМЯЛ в окрестности тромбов. При помощи разработанной модели показано, что при онкологии рост тромбов замедлен – относительный размер тромбов при раке молочной железы составляет $21 \pm 11\%$ от поля зрения по сравнению с $39 \pm 10\%$ у здоровых мышей. При этом количество ПМЯЛ, адгезирующих к тромбам, и скорость их движения на подложке не отличаются у здоровых мышей и мышей с опухолями. Однако количество ПМЯЛ, покидающих тромб и сползающих на фибронектин-коллагеновый матрикс, значительно увеличено у мышей с опухолью (39 ± 23 против 15 ± 8 у здоровых контролей). Таким образом, с помощью разработанной модели тромбовоспаления показано, что уже на ранних этапах развития опухоли наблюдаются нарушения процесса тромбовоспаления.

Ключевые слова: тромбовоспаление, тромбоциты, полиморфоядерные лейкоциты, нейтрофилы, рак молочной железы, мышьяная модель опухоли

DOI: 10.31857/S0869813925020057, **EDN:** UIWBQP

ВВЕДЕНИЕ

Тромбовоспаление – это комплексное взаимодействие между системой гемостаза и иммунной системой. Считается, что тромбовоспаление в основном обусловлено взаимодействием между гранулоцитами и тромбоцитами [1]. Когда тромбоциты активируются на месте повреждения или воспаления, они секретируют гранулы, содержащие фибриноген, фактор Виллебранда (vWF), факторы роста и хемоаттрактанты для лейкоцитов, например, АДФ или IL-8, что привлекает нейтрофилы к месту повреждения [2, 3]. Нейтрофилы способны адгезировать к тромбоцитарному агрегату через связи PSGL-1/P-селектин, Mac1/фибриноген/GPIIb/IIIa, CD40/CD40L и т.п., таким образом способствуя тромбообразованию как путем образования внеклеточных ДНК-ловушек [4], так и путем активации и привлечения тромбоцитов [5] или элиминирования прокоагулянтных тромбоцитов [6], ограничивающих рост тромба [7].

Тромбовоспаление часто связывают с развитием и прогрессированием онкологических заболеваний [8]. Нарушения тромбовоспаления в онкологии могут напрямую влиять на гемостаз [9], при этом у примерно 15% пациентов развиваются гипер- или гипокоагуляцию [10], а тромбоциты находятся в преактивированном состоянии [11]. Кроме того, одновременная активация тромбоцитов и нейтрофилов может привести к усилению метастазирования опухоли, опосредованному цитокинами и ДНК-ловушками [9, 12]. Опухоль-ассоциированные нейтрофилы также во многих работах связывают с неблагоприятным прогнозом для рака молочной железы [13], легких [14], поджелудочной железы [15] и почек [16]. С другой стороны, было показано, что в мышинных моделях различных типов рака подавление рекрутирования нейтрофилов в опухоль ускоряет ее рост и усиливает метастазирование [17–19]. Таким образом, исследование тромбовоспаления при онкологических заболеваниях является крайне востребованным.

Ранее мы предложили экспериментальную постановку для *ex vivo* оценки тромбовоспалительного потенциала образцов крови [6]. В данной постановке наблюдается движение полиморфоядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) в окрестности растущих на покрытой фибриллярным коллагеном I типа подложке тромбоцитарных агрегатов (тромбов). При этом возможно наблюдение как агрегационной способности тромбоцитов по площадям тромбов [20, 21], так и адгезии ПМЯЛ к тромбам, их скорости движения [6], и способности к направленному движению и чувствительности к хемоаттрактантам [22]. Более того, мы показали, что ПМЯЛ аналогично ведут себя в окрестностях гетероагрегатов тромбоцитов и опухолевых клеток [22].

Первое применение описанного метода наблюдения тромбовоспаления у пациентов с раком молочной железы показало, что как площади тромбов, так и активность нейтрофилов у таких пациентов крайне гетерогенны, что скорее всего связано с гетерогенностью группы пациентов [23]. Поэтому актуально развитие аналогичного подхода для мышинных моделей. Однако широко использующиеся модели тромбовоспаления у мышей являются *in vivo* моделями [24, 25]. Такие модели имеют ряд преимуществ, например меньшее влияние преаналитики на состояние гемостаза, однако для *in vivo* моделей затруднен анализ движения нейтрофилов и динамики роста тромба. Невозможна также дальнейшая адаптация таких моделей для прогноза течения заболевания у людей.

Целями настоящей работы является разработка *ex vivo* модели тромбовоспаления у мышей, а также анализ состояния тромбовоспаления в мышинной модели рака молочной железы ЕМТ-6 на ранней стадии туморогенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы

В настоящей работе были использованы следующие реагенты: Annexin V-Alexa Fluor 647 (BioLegend, San Diego, Калифорния, США); DiOC₃(6), HEPES, бычий сывороточный альбумин, Hoechst-33342, PBS (Sigma-Aldrich, St Louis, США); фибрилляр-

ный коллаген I типа (Chrono-Log Corporation; Havertown; США); фибронектин плазмы крови человека (H Fnc-5C, ООО «Имтек», Россия).

In vivo модель рака молочной железы EMT-6

Для *in vivo* модели рака молочной железы EMT-6 использовались 8–9-недельные самки мышей линии BALB/c (питомник лабораторных животных “Пушино”, г. Пушкино, Россия). Животные содержались в стандартных условиях [26]. Ортопическая инокуляция суспензии клеток EMT-6 осуществлялась по методике, предложенной Tavera-Mendoza с соавт. [27], с некоторыми изменениями и подробно описана в работе [26]. Вкратце, под анестезией животному в жировую подушечку в области правого соска 4-й пары молочных желез вводилось 100 мкл суспензии клеток EMT-6 (в концентрации 10^7 клеток/мл) в растворе солей Хэнкса (HBSS). На 8–9-й день после инокуляции мыши анестезировались внутримышечным введением смеси 50 мг/кг золетила-100 и 5 мг/кг ксилазина. После наступления глубокого наркоза у мышей бралась кровь из ретро-орбитального синуса, после чего мыши эвтаназировались путем цервикальной дислокации.

Взятие крови и выделение тромбоцитов

Кровь у мышей была взята с помощью 1–1.5-сантиметровых стеклянных гепаринизированных капилляров (Macherey-Nagel, Германия) из ретро-орбитального синуса в пробирку с раствором гирудина (1 МЕ/мл) в модифицированном буфере Тироде (мМ) 150 NaCl, 2.7 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 0.4 NaH₂PO₄, 0.4 NaHCO₃, 5 HEPES, 5 D-глюкозы, 0.5% бычьего сывороточного альбумина, pH 7.35). Объемная доля раствора антикоагулянта не превышала 10% от объема взятой крови.

Проточные камеры

Основываясь на ранее опубликованных работах, исследования роста тромбов, взаимодействия нейтрофилов с тромбами и их активности производились при помощи флуоресцентной микроскопии путем прокачивания цельной крови, нагруженной красителями DiOC₃(6), Hoechst 33342 и Annexin V-Alexa Fluor 647, через проточные камеры, покрытые коллагеном и фибронектином. Использовались следующие параметры канала: 0.05 × 18 × 2 мм. Покровные стекла покрывали фибриллярным коллагеном типа I (0.2 мг/мл), разведенным в уксусной кислоте (0.1%) в течение 90 мин при 37 °С. Далее стекла промывали дистиллированной водой и инкубировали с фибронектином 4 мг/мл в течение 1 ч, промывали дистиллированной водой и вставляли в проточные камеры. Далее проточные камеры инкубировали в буфере Тироде с 2% альбумина 30 мин при 37 °С. После добавления флуоресцентных реагентов (DiOC₃(6) (1 мкМ), Hoechst 33342 (2 мкг/мл) и AnnexinV-Alexa647 (10 мкг/мл)) кровь перфузировали через камеры со скоростью сдвига 100 с⁻¹. Рост тромба и перемещение лейкоцитов наблюдались в режиме эпифлуоресценции с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti (объектив Plan Apo λ 40x/0.95). Оклюзия проточной камеры визуально оценивалась через 30 мин съемки после выкачки крови из камеры.

Обработка данных и программное обеспечение

Программное обеспечение Nikon NIS-Elements использовалось для получения изображений с микроскопа; ImageJ (<http://imagej.net/ImageJ>) применялся для обработки изображений. Плагин Manual Tracking в ImageJ использовался для ручного отслеживания ПМЯЛ, которые идентифицировались как ядерные клетки с 3-4 сегментами ядра при наблюдении по окраске Hoechst 33342. Местоположение тромбов определялось с помощью программного пакета ilastik (<http://ilastik.org>). Площадь тромбоцитарных тромбов рассчитывалась как доля поля зрения, покрытая тромбами.

Статистика

Все эксперименты проводились минимум в трех повторах с использованием крови от различных мышей. Данные приведены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистический анализ проводился с использованием Python 3.6; все статистические данные приведены в подписях к рисункам. Визуализация данных производилась при помощи программного пакета GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка ex vivo экспериментальной модели тромбовоспаления в цельной мышинной крови

Для разработки *ex vivo* мышинной модели тромбовоспаления в цельной крови мыши нами был рассмотрен ряд белковых матриксов, моделирующих поверхность поврежденного сосуда. По аналогии с предыдущими работами [6, 22] были проведены эксперименты по росту тромба на подложке с фибриллярным коллагеном I типа (рис. 1a). На данном виде подложки росли хорошо оформленные тромбы, на 25-й минуте достигающие площади до 50% поля зрения (рис. 1a). За весь период эксперимента наблюдались адгезия от 30 до 45 лейкоцитов, однако клетки преимущественно прикреплялись к тромбу и были неподвижны. Таким образом, использование коллагена в качестве подложки не позволяло исследовать такой параметр тромбовоспаления, как хемотаксис ПМЯЛ к растущему тромбу.

При использовании подложки, покрытой только фибронектином, формирование полноценного тромба не происходило (рис. 1b). Наблюдалась адгезия большого количества одиночных тромбоцитов и формирование кластеров одиночных тромбоцитов; при этом, в отличие от коллагеновой подложки, в таких кластерах отдельные тромбоциты оставались различимы при наблюдении по каналу DiOC₃(6). Адгезия лейкоцитов происходила в единичных количествах (рис. 1e). Как и в случае с коллагеном, они преимущественно адгезировали к кластерам тромбоцитов и оставались неподвижными.

В случае подложки с фибронектином и коллагеном наблюдался взрывной рост тромбов с пятой минуты прокачки крови (рис. 1c). Площади тромба достигали до 90% поля зрения (рис. 1d), при этом для 5 из 6 здоровых мышей после окончания эксперимента обнаруживалась окклюзия канала проточной камеры тромбом. На протяжении эксперимента к комбинированной подложке адгезировало значительно больше лейкоцитов, чем к подложке только с фибронектином или только с коллагеном (рис. 1e). При этом для количества ПМЯЛ, адгезировавших на комбинированную подложку за все время съемки, наблюдался значительный разброс (рис. 1f). При отдельном подсчете ПМЯЛ, адгезировавших с 10-й по 20-ю мин и с 20-й по 30-ю мин, оказалось, что количество лейкоцитов во второй временной интервал имеет меньший разброс. Вероятно, большой разброс в количестве адгезировавших ПМЯЛ с 20-й по 30-ю мин связан с наступающей в этот интервал частичной окклюзией проточной камеры растущим тромбом и отсутствием адгезии новых ПМЯЛ, приносимых потоком крови, в окклюдившем регионе.

Таким образом, для дальнейшего исследования тромбовоспаления у мышей был выбран следующий набор экспериментальных параметров. Для наблюдения тромбовоспаления использовалась подложка из комбинации коллагена и фибронектина. При дальнейшем анализе для сравнения со здоровыми контролями рассматривались площади тромба на 5-, 10- и 25-й минутах съемки. Анализ количества адгезировавших лейкоцитов и характера их движения вокруг растущего тромба производился с 10-й по 20-ю мин съемки, так как после 20-й мин возможна частичная окклюзия и изменение гемодинамики.

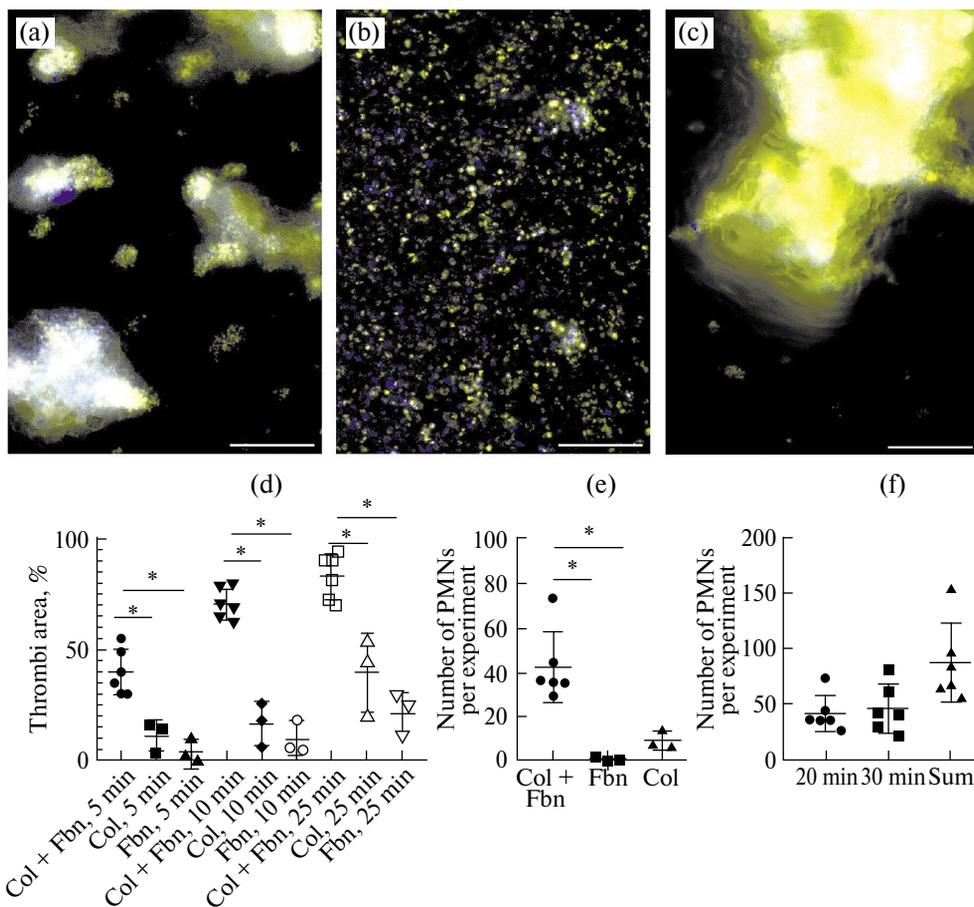


Рис. 1. Разработка мышиной модели тромбовоспаления: (a) – характерный вид растущего тромба, подложка – коллаген, 200 мкг/мл; (b) – характерный вид растущего тромба, подложка – фибронектин, 4 мкг/мл; (c) – характерный вид растущего тромба, подложка – коллаген 200 мкг/мл + фибронектин 4 мкг/мл; (a-c) – масштабный отрезок 25 мкм, синий – ДНК/полифосфаты тромбоцитарных гранул (Hoechst33342), желтый – тромбы (DiOC₆); (d) – сравнение площади тромбов для различных подложек: Col+Fbn (коллаген 200 мкг/мл + фибронектин 4 мкг/мл), Col (коллаген 200 мкг/мл), Fbn (фибронектин 4 мкг/мл); (e) – сравнение количества ПМЯЛ, адгезировавших к различным подложкам, за всю продолжительность эксперимента. Col+Fbn (коллаген 200 мкг/мл + фибронектин 4 мкг/мл), Col (коллаген 200 мкг/мл), Fbn (фибронектин 4 мкг/мл); (f) – количество ПМЯЛ, адгезировавших к коллаген-фибронектиновой подложке на разных временах эксперимента. Для сравнения выборок использован критерий Манна-Уитни. * – соответствует $p < 0.05$.

В модели рака молочной железы у мышей наблюдается нарушение тромбообразования

При помощи разработанной модели тромбовоспаления нами был проанализирован рост тромбов у мышей, инокулированных клетками опухоли ЕМТ-6 (модель рака молочной железы, РМЖ). Было показано, что у мышей с РМЖ рост тромбов замедлен (рис. 2а, б). Так, на 5-й мин размер тромбов у мышей с опухолью составляет $21 \pm 11\%$ от поля зрения по сравнению с $39 \pm 10\%$ у здоровых мышей, на 10-й мин – $41 \pm 14\%$ и $70 \pm 7\%$ от поля зрения у опухолевых и здоровых мышей соответственно (рис. 3а).

При этом сокращение площади тромба происходило за счет уменьшения количества больших агрегатов тромбоцитов с линейными размерами > 60 мкм (рис. 2а–с). При этом статистического различия для площади тромба на 25-й мин ($82 \pm 10\%$ у здоровых мышей против $76 \pm 15\%$ для мышей с опухолями) не наблюдалось (рис. 3а). Но несмотря на отсутствие различий для площадей тромба, окклюзия канала растущим тромбом наблюдалась только у мышей № 2 и № 5, в то время как у 5 из 6 здоровых мышей наблюдалась окклюзия, что может указывать на затрудненный рост тромба в вертикальном направлении.

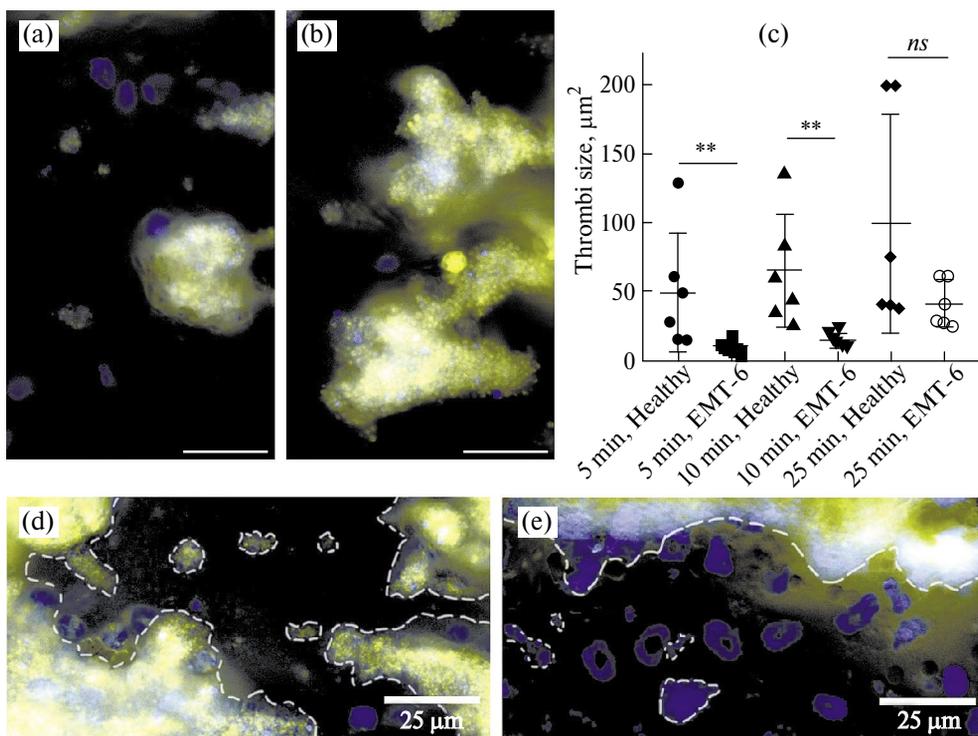


Рис. 2. Нарушение тромбообразования у мышей с раком молочной железы: (а) – типичное поле зрения через 15 мин эксперимента у мыши с РМЖ; (б) – типичное поле зрения через 15 мин эксперимента у здоровой мыши; (с) – средний размер тромбов на 5-й и 10-й мин значительно меньше у мышей с РМЖ, чем у здоровых мышей. Статистически значимых различий на 25-й минуте нет; (д) – типичный вид лейкоцитов для здоровых мышей; (е) – типичный вид лейкоцитов вне тромба у мышей с опухолями. Синий – ДНК/полифосфаты тромбоцитарных гранул (Hoechst33342), желтый – тромбы (DiOC₃(6)). Масштабный отрезок 25 мкм.

Лейкоциты мышей с РМЖ более склонны покидать тромбы и перемещаться по подложке, чем лейкоциты здоровых контролей

Далее нами было произведено сравнение взаимодействия ПМЯЛ с растущим тромбом у здоровых контролей и мышей с ЕМТ-6. Для начала было подсчитано количество лейкоцитов, адгезировавших либо к подложке, либо к растущему тромбу в период с 10-й по 20-ю мин эксперимента для исключения влияния окклюзии тромбов на результаты. Количество лейкоцитов в этот период не отличалось для здоровых контролей и мышей с опухолями (рис. 3с); неизменными остались скорости движения ПМЯЛ, адгезировавших к подложке (рис. 3б) (для ПМЯЛ, находящихся в тромбе, подсчет ско-

ростей был затруднителен из-за трехмерного характера движения клеток), а также отношение количества адгезировавших ПМЯЛ к площади тромба. Последний параметр был выбран из-за того, что у мышей, в отличие от человека, адгезия ПМЯЛ всегда проходила сначала непосредственно к растущему тромбу, и только потом происходило сползание ПМЯЛ с тромба на подложку. Неожиданно, но способность тромбов привлекать лейкоциты не отличалась для здоровых контролей и мышей с опухолями, несмотря на нарушенный рост тромба у последних.

Однако мы заметили, что количество ПМЯЛ, покидающих тромб и сползающих на фибронектин-коллагеновый матрикс, было значимо увеличено у мышей с опухолью (рис. 3д, 39 ± 23 для мышей с РМЖ против 15 ± 8 у здоровых контролей) и положительно коррелировало с размером опухоли (рис. 3е). Также отличалась морфология лейкоцитов. Если у здоровых контролей лейкоциты преимущественно располагались на тромбах и имели округлые ядра (рис. 2с), то у мышей с опухолями в большом количестве наблюдались распластанные клетки с кольцевым ядром (рис. 2д).

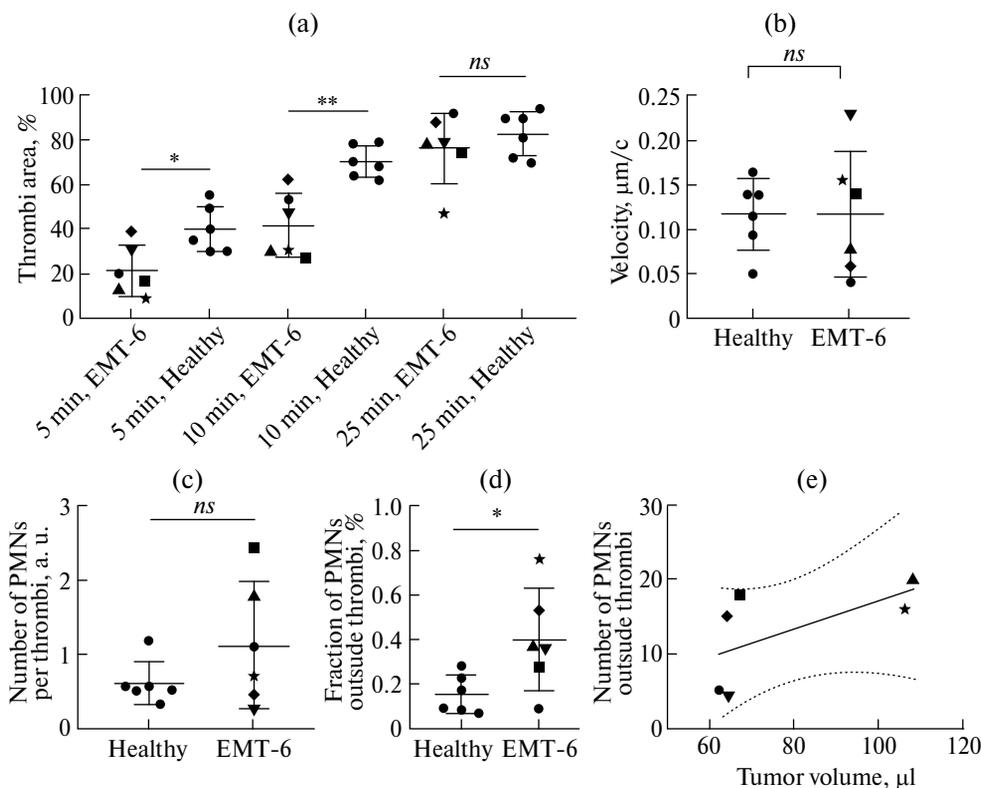


Рис. 3. Особенности взаимодействия лейкоцитов и тромбоцитов у мышей с РМЖ: (а) – площади тромба на 5-й и 10-й мин значимо меньше у мышей с РМЖ, чем у здоровых мышей. Статистически значимых различий на 25-й мин нет; (б) – скорость движения ПМЯЛ значимо не отличается для здоровых контролей и мышей с опухолями; (с) – отношение количества ПМЯЛ к площадям тромба значимо не отличается для здоровых контролей и мышей с опухолями; (д) – доля ПМЯЛ вне тромба значимо выше для мышей с опухолями по сравнению со здоровыми контролями; (е) – количество ПМЯЛ вне тромба коррелирует с размером опухоли для мышей с РМЖ. Данные для каждой мыши с опухолью обозначены символами: квадрат – мышь № 1, треугольник – мышь № 2, звезда – мышь № 3, перевернутый треугольник – мышь № 4, круг – мышь № 5 и ромб – мышь № 6. Для сравнения использован критерий Манна–Уитни. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе предложена экспериментальная методика наблюдения процесса тромбовоспаления в образцах мышинной крови *ex vivo*. Было показано, что использование комбинации фибронектина и коллагена для имитации повреждения сосуда позволяет моделировать процессы роста тромба и окклюзии сосуда, а также отслеживать адгезию и движение лейкоцитов в окрестности растущего тромба.

При этом, в отличие от случая использования таких подложек для наблюдения тромбовоспаления в цельной крови людей [22], для цельной крови мыши не наблюдалось прямой адгезии лейкоцитов на подложку. В данной экспериментальной модели ПМЯЛ осуществляли только тромб-опосредованную адгезию и дальнейшее сползание с тромба на матрикс. Возможно, это связано с недостаточной преактивацией нейтрофилов мыши в потоке, так как интегрины $\alpha_M\beta_2$, $\alpha4\beta1$ и $\alpha5\beta1$, использующиеся нейтрофилами человека для адгезии к этим подложкам, присутствуют и в клетках мыши [28]. Наблюдаемые эффекты можно объяснить высоким сродством фибронектина к денатурированному коллагену – желатину [29]. Так как в условиях эксперимента происходит частичная денатурация коллагена, вероятно, это приводит к высокой адсорбции фибронектина к подложке с коллагеном, что может приводить к тромбообразованию за счет активации тромбоцитов от фибронектин-коллагенового матрикса [30]. Привлечение лейкоцитов может происходить как за счет повышенной секреции хемоаттрактантов быстрорастущими тромбами [22], так и за счет распознавания фибронектин-коллагенового матрикса как маркера воспалительного процесса [31, 32].

С помощью разработанной модели тромбовоспаления нами был проанализирован рост тромбов в образцах крови мышей с моделью РМЖ. Было показано, что у таких мышей замедлено тромбообразование по сравнению со здоровыми контролями, а также нарушен рост тромба по вертикали. Это, с одной стороны, противоречит данным о том, что прогрессия онкологического заболевания коррелирует с преактивацией тромбоцитов [33], но, с другой стороны, может указывать на вызванную преактивацией десенситизацию тромбоцитов и усиление их элиминации [9, 34].

Наблюдаемые различия в состоянии лейкоцитов мышей с РМЖ сводятся к доминированию распластанных клеток с сильно сегментированным ядром (рис. 3), которые, однако, могут соответствовать морфологии нейтрофилов здоровой мыши [35]. Вторым отличием является значимое увеличение доли ПМЯЛ, покидающих тромб (рис. 3), которое коррелировало с размером опухоли. Это может опосредованно быть связано с преактивацией нейтрофилов, которая может наблюдаться при различных типах онкологий как у человека [36], так и мыши [37], однако механизм усиления сползания с тромбов также требует дальнейшего изучения.

Таким образом, с помощью разработанного протокола было показано, что уже на ранних этапах развития опухоли у мышей наблюдается замедление скорости роста тромбов, а также переход ПМЯЛ в преактивированное состояние.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят И.С. Колесникову (Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН) за помощь в культивировании культуры ЕМТ-6 и М.А. Пантелеева (Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН) за плодотворное обсуждение исследования.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Ю. Д. Д.К. и А. Н. С.), сбор данных (Ю. Д. Д.К., А. А. М., Е. О. О.), обработка данных (Ю. Д. Д.К., А. А. М.), написание и редактирование манускрипта (Ю. Д. Д.К., А. А. М., Е. О. О., А. Н. С.)

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Настоящая работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 23-45-10039). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комитетом по биоэтике Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН (протокол №1/1_24 от 25 января 2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы настоящей работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Darbousset R, Mezouar S, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C* (2014) Involvement of neutrophils in thrombus formation in living mice. *Pathol Biol* 62: 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.patbio.2013.11.002>
2. *Italiano Jr JE, Battinelli EM* (2009) Selective sorting of alpha-granule proteins. *J Thromb Haemost* 7: 173–176.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03387.x>
3. *Parsons MEM, Szklanna PB, Guerrero JA, Wynne K, Dervin F, O'Connell K, Allen S, Egan K, Bennett C, McGuigan C, Gheveart C, Ni Ainle F, Maguire PB* (2018) Platelet releasate proteome profiling reveals a core set of proteins with low variance between healthy adults. *Proteomics* 18: 1800219.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201800219>
4. *Sveshnikova AN, Adamanskaya EA, Pantelev MA* (2024) Conditions for the implementation of the phenomenon of programmed death of neutrophils with the appearance of DNA extracellular traps during thrombus formation. *Pediatr Hematol Immunopathol* 23: 211–218.
<https://doi.org/10.24287/1726-1708-2024-23-1-211-218>
5. *Schönichen C, Montague SJ, Brouns SLN, Burston JJ, Cosemans JM, Jurk K, Kehrel BE, Koenen RR, Ni Ainle F, O'Donnell VB, Soehnlein O, Watson SP, Kuijpers MJE, Heemskerk JWM, Nagy M* (2023) Antagonistic roles of human platelet integrin α IIb β 3 and chemokines in regulating neutrophil activation and fate on arterial thrombi under flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 43: 1700–1712.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318767>
6. *Morozova DS, Martyanov AA, Obydennyi SI, Korobkin J-JD, Sokolov AV, Shamova EV, Gorudko IV, Khoreva AL, Shcherbina A, Pantelev MA, Sveshnikova AN* (2022) Ex vivo observation of granulocyte activity during thrombus formation. *BMC Biol* 20: 32.
<https://doi.org/10.1186/s12915-022-01238-x>
7. *Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO, Shepelyuk TO, Yakusheva AA, Kerimov RR, Obydennyi SI, Eckly A, Léon C, Gachet C, Grishchuk EL, Ataullakhanov FI, Mangin PH, Pantelev MA* (2019) Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39: 37–47.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311390>
8. *Schattnr M, Jenne CN, Negrotto S, Ho-Tin-Noe B* (2020) editorial: Platelets and immune responses during thromboinflammation. *Front Immunol* 11: 1079.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01079>
9. *Sveshnikova AN, Tesakov IP, Kuznetsova SA, Shamova EM* (2024) Role of platelet activation in the development and metastasis of solid tumors. *J Evol Biochem Physiol* 60: 211–227.
<https://doi.org/10.1134/S0022093024010150>
10. *Sohal S, Thakur A, Zia A, Sous M, Trelles D* (2020) Disseminated intravascular coagulation and malignancy: A case report and literature review. *Case Rep Oncol Med* 2020: 1–5.
<https://doi.org/10.1155/2020/9147105>
11. *Li B, Lu Z, Yang Z, Zhang X, Wang M, Chu T, Wang P, Qi F, Anderson GJ, Jiang E, Song Z, Nie G, Li S* (2023) Monitoring circulating platelet activity to predict cancer-associated thrombosis. *Cell Rep Methods* 3: 100513.
<https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100513>

12. *De Meo ML, Spicer JD* (2021) The role of neutrophil extracellular traps in cancer progression and metastasis. *Semin Immunol* 57: 101595.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2022.101595>
13. *Kakumoto A* (2024) Prognostic impact of tumor-associated neutrophils in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 17: 51–62.
<https://doi.org/10.62347/JQDQ1527>
14. *Taucher E, Taucher V, Fink-Neuboeck N, Lindenmann J, Smolle-Juettner F-M* (2021) role of tumor-associated neutrophils in the molecular carcinogenesis of the lung. *Cancers* 13: 5972.
<https://doi.org/10.3390/cancers13235972>
15. *Jin L, Kim HS, Shi J* (2021) Neutrophil in the pancreatic tumor microenvironment. *Biomolecules* 11: 1170.
<https://doi.org/10.3390/biom11081170>
16. *Margaroli C, Cardenas MA, Jansen CS, Moon Reyes A, Hosseinzadeh F, Hong G, Zhang Y, Kissick H, Trouvanziam R, Master VA* (2020) The immunosuppressive phenotype of tumor-infiltrating neutrophils is associated with obesity in kidney cancer patients. *Oncol Immunology* 9: 1747731.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1747731>
17. *Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM* (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : «N1» versus «N2» TAN. *Cancer Cell* 16: 183–194.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>
18. *Schaider H, Oka M, Bogenrieder T, Nesbit M, Satyamoorthy K, Berking C, Matsushima K, Herlyn M* (2003) Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. *Int J Cancer* 103: 335–343.
<https://doi.org/10.1002/ijc.10775>
19. *Musiani P, Allione A, Modica A, Lollini PL, Giovarelli M, Cavallo F, Belardelli F, Forni G, Modesti A* (1996) Role of neutrophils and lymphocytes in inhibition of a mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IFN-alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 74: 146–157
20. *Martyanov AA, Morozova DS, Sorokina MA, Filkova AA, Fedorova DV, Uzueva SS, Suntsova EV, Novichkova GA, Zharkov PA, Pantelev MA, Sveshnikova AN* (2020) Heterogeneity of integrin α IIb β 3 function in pediatric immune thrombocytopenia revealed by continuous flow cytometry analysis. *Int J Mol Sci* 21: 3035.
<https://doi.org/10.3390/ijms21093035>
21. *Martyanov AA, Tesakov IP, Khachatryan LA, An OI, Boldova AE, Ignatova AA, Koltsova EM, Korobkin J-JD, Podoplelova NA, Svidelskaya GS, Yushkova E, Novichkova GA, Eble JA, Pantelev MA, Kalinin DV, Sveshnikova AN* (2023) Platelet functional abnormalities in pediatric patients with kaposiform hemangioendothelioma/Kasabach-Merritt phenomenon. *Blood Adv* 7: 4936–4949.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009590>
22. *Korobkin J-JD, Deordieva EA, Tesakov IP, Adamanskaya E-IA, Boldova AE, Boldyreva AA, Galkina SV, Lazutova DP, Martyanov AA, Pustovalov VA, Novichkova GA, Shcherbina A, Pantelev MA, Sveshnikova AN* (2024) Dissecting thrombus-directed chemotaxis and random movement in neutrophil near-thrombus motion in flow chambers. *BMC Biol* 22: 115.
<https://doi.org/10.1186/s12915-024-01912-2>
23. *Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, Damti P, Lumbruso D, Polyansky L, Sionov RV, Ariel A, Hovav A-H, Henke E, Fridlender ZG, Granot Z* (2015) Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep* 10: 562–573.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.039>
24. *Tucker EI, Verbout NG, Leung PY, Hurst S, McCarty OJT, Gailani D, Gruber A* (2012) Inhibition of factor XI activation attenuates inflammation and other host defense mechanisms while improving the survival of mouse polymicrobial sepsis. *Blood* 119: 4762–4768.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386185>
25. *Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM* (2019) Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood* 133: 906–918.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-882993>
26. *Mishukov AA, Gaur S, Adamanskaya E-IA, Pantelev M, Sveshnikova AN* (2024) Evaluation of platelet functional activity in healthy BALB/c mice and in EMT-6 breast cancer orthotopic model. *J Evol Biochem Physiol* 61.
27. *Tavera-Mendoza LE, Brown M* (2017) A less invasive method for orthotopic injection of breast cancer cells into the mouse mammary gland. *Lab Anim* 51: 85–88.
<https://doi.org/10.1177/0023677216640706>

28. Pulikott S, Hu L, Chen Y, Sun H, Fan Z (2022) Integrin regulators in neutrophils. *Cells* 11: 2025. <https://doi.org/10.3390/cells11132025>
29. Ingham KC, Brew SA, Isaacs BS (1988) Interaction of fibronectin and its gelatin-binding domains with fluorescent-labeled chains of type I collagen. *J Biol Chem* 263: 4624–4628. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68828-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68828-3)
30. Ni H, Yuen PST, Papalia JM, Trevithick JE, Sakai T, Fässler R, Hynes RO, Wagner DD (2003) Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2415–2419. <https://doi.org/10.1073/pnas.2628067100>
31. Everitt EA, Malik AB, Hendey B (1996) Fibronectin enhances the migration rate of human neutrophils in vitro. *J Leukoc Biol* 60: 199–206. <https://doi.org/10.1002/jlb.60.2.199>
32. Boneschansker L, Jorgensen J, Ellett F, Briscoe DM, Irimia D (2018) Convergent and divergent migratory patterns of human neutrophils inside microfluidic mazes. *Sci Rep* 8: 1887. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20060-6>
33. Trivanović D, Mojsilović S, Bogosavljević N, Jurišić V, Jauković A (2024) Revealing profile of cancer-educated platelets and their factors to foster immunotherapy development. *Transl Oncol* 40: 101871. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2023.101871>
34. Kawano T, Hisada Y, Grover SP, Schug WJ, Paul DS, Bergmeier W, Mackman N (2023) Decreased platelet reactivity and function in a mouse model of human pancreatic cancer. *Thromb Haemost* 123: 501–509. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1761419>
35. Biermann H, Pietz B, Dreier R, Schmid KW, Sorg C, Sunderkötter C (1999) Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. *J Leukoc Biol* 65: 217–231. <https://doi.org/10.1002/jlb.65.2.217>
36. Gruijs M, Sewnath CAN, Van Egmond M (2021) Therapeutic exploitation of neutrophils to fight cancer. *Semin Immunol* 57: 101581. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101581>
37. Brewer G (2023) Activated neutrophils: the anti-hero. *Nat Rev Cancer* 23: 190. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00555-9>

Ex vivo Murine Thromboinflammation Model with Validation on EMT-6 Breast Cancer**J. J. D. Korobkin^a, A. A. Mishukov^a, E. O. Osidak^b, and A. N. Sveshnikova^{a, b, *}**^a*Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, Russia*^b*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia*^b*Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia*^{*}*E-mail: asvebnikova@yandex.ru*

Thromboinflammation is a complex interaction between the hemostasis system and the immune system associated with the participation of neutrophils in the process of thrombosis. An imbalance in the mutual activation of platelets and neutrophils in various pathologies leads to thrombosis or bleeding. Previously, we developed a technique for ex vivo observation of the process of thrombosis and chemotaxis of neutrophils in parallel-plate flow chambers coated with fibrillar collagen. The aim of this work was to develop a technique for ex vivo observation of the thromboinflammation process in mice, which allows analyzing the interaction of polymorphonuclear leukocytes (PMN) with growing blood clots. To validate the technique, a breast cancer model was used in BALB/c mice (7 days after orthotopic inoculation with EMT-6 tumor cell culture). In the blood samples of healthy mice, blood clots formed on fibrillar collagen, however, nuclear cells were not observed. The use of a combination of fibronectin and collagen as a substrate made it possible to induce thrombosis and monitor the movement and behavior of PMNs in the vicinity of blood clots. Using the developed model, it was shown that in breast cancer, the growth of blood clots is slowed down – the relative size of blood clots in breast cancer is $21 \pm 11\%$ of the field of view compared with $39 \pm 10\%$ in healthy mice. At the same time, the number of PMNs adhering to blood clots and the speed of their movement on the substrate do not differ in healthy mice and mice with tumors. However, the number of PMNs leaving the thrombus and sliding onto the fibronectin-collagen matrix was significantly increased in mice with a tumor (39 ± 23 versus 15 ± 8 in healthy controls). Thus, using the developed thromboinflammation model, it is shown that already at the early stages of tumor development, violations of the thromboinflammation process are observed.

Keywords: thromboinflammation, platelets, polymorphonuclear leukocytes, neutrophils, breast cancer, murine tumor model