

На правах рукописи

СУНБУЛИ ХЕТАМ

**ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ
НЕЙТРОФИЛОВ И ОСОБЕННОСТИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С
ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ**

1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Научный руководитель:

Алексеева Людмила Александровна, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, младший научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот.

Официальные оппоненты:

Рыкова Елена Юрьевна, д.б.н., проф., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов.

Коваль Ольга Александровна, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии.

Тыринова Тамара Викторовна, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, заведующий лабораторией клеточно-молекулярных механизмов иммунопатологии, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: проспект Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИХБФМ СО РАН и на сайте ИАС www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук

Пестряков П. Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Нейтрофилы представляют собой наиболее многочисленную популяцию циркулирующих лейкоцитов и опосредуют самые ранние фазы воспалительных реакций. Нейтрофилы долго воспринимались только как первичный барьер широкого спектра действия на пути патогена, в первую очередь, из-за короткой продолжительности жизни нейтрофилов, а также из-за ограниченного инструментария исследователей. Однако, недавние исследования выявили гетерогенность фенотипа и функций нейтрофилов как в тканях здорового организма, так и при патологиях.

В опухолях встречаются опухоль-ассоциированные нейтрофилы (Tumor-associated neutrophils, TAN) двух условных фенотипов: N1 (противоопухолевый) и N2 (проопухолевый). Опухолевые клетки и клетки опухолевого микроокружения активно продуцируют TGF- β , что способствует поляризации нейтрофилов в N2 фенотип, а IFN- β способствует поляризации нейтрофилов в N1 фенотип; однако поляризация нейтрофилов является сложным процессом, на который влияют множество факторов опухоли и её микроокружения. В связи с этим накапливаются противоречивые данные о влиянии нейтрофилов на опухоль, и изучение фенотипа и функционирования нейтрофилов при развитии опухолей остаётся актуальным.

Для изучения фенотипа TAN в данной работе предлагается использовать нейтрофилы селезенки, так как они отражают функциональное состояние нейтрофилов, выполнивших свою роль в организме, и поступивших в селезенку для клиренса. В отличие от нейтрофилов костного мозга, нейтрофилы селезенки характеризуются относительно высокой степенью зрелости с сохраненной функциональностью.

TAN способны формировать нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps, NET), фибриновые структуры, состоящие из генетического материала нейтрофилов, белков и гранул. NET могут способствовать метастазированию и росту опухоли, защищая опухоль и циркулирующие опухолевые клетки от иммунной системы, а также разрушая внеклеточный матрикс и способствуя формированию преметастатической ниши. Поэтому ингибирование нетоза или деградация NET рассматривается как перспективное направление терапии опухолевых заболеваний.

В ряде исследований показано, что у онкологических больных уровень внеклеточной ДНК (внДНК) в крови повышен, в том числе за счёт повышенного выброса NET нейтрофилами. Повышение уровней внДНК и NET часто сопровождается снижением ДНКазной активности крови. Сотрудниками лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН (института, в котором выполнялось данное исследование) было показано, что бычья панкреатическая ДНКаза I проявляла противоопухолевое и антиметастатическое действие в отношении различных моделей опухоли мыши, что подтверждено другими исследованиями.

Цель и задачи исследования

Целью нашего исследования являлась характеристика опухолево-ассоциированных нейтрофилов и изучение их противоопухолевого потенциала.

В ходе исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработка протокола получения нейтрофилов из селезенки мышей и оценка их функциональной активности.
2. Выбор референсных генов для исследования фенотипа нейтрофилов селезенки здоровых мышей и мышей-опухоленосителей методом RT-qPCR.
3. Исследование фенотипа нейтрофилов селезенки мышей с различными типами опухолей.
4. Изучение изменения фенотипа нейтрофилов при снижении инвазивного потенциала опухоли под действием бычьей панкреатической ДНКазы I.
5. Исследование способности опухолево-ассоциированных нейтрофилов к образованию нейтрофильных ловушек (NET), в том числе после терапии ДНКазой I.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Оптимальным методом для выделения нейтрофилов из селезенки мышей является метод иммуномагнитной положительной селекции, который позволяет получить фракцию нейтрофилов с сохранённой функциональной активностью с высокой чистотой и жизнеспособностью.
2. Оптимальными референсными генами для исследования нейтрофилов мыши методом RT-qPCR являются *Tbp* и *Hprt1*, стабильно экспрессирующиеся в наивных незрелых нейтрофилах костного мозга и зрелых нейтрофилах селезенки здоровых мышей и мышей с разными типами опухолей вне зависимости от статуса активации клеток.
3. Фенотип нейтрофилов в селезенке мышей с опухолями зависит от стадии и типа опухоли. При стабильной прогрессии карциномы легких Льюис (LLC) нейтрофилы проявляют иммуносупрессивный проопухолевый фенотип, способствующий уклонению опухоли от иммунного надзора. При агрессивном росте опухоли лимфосаркомы RLS₄₀ обнаружены нейтрофилы иммуносупрессивного фенотипа, тогда как при подавлении роста опухоли под действием иммунной системы наблюдаются нейтрофилы с противоопухолевым фенотипом.
4. Введение противоопухолевого агента (ДНКазы I) мышам с RLS₄₀, оказывавшего противоопухолевый, антиметастатический и иммуностимулирующий эффект, модифицирует профиль нейтрофилов: в них происходит снижение уровня мРНК иммуносупрессивных маркеров (*Il10*, *Ccl17*) и повышение экспрессии противоопухолевого маркера FAS и иммунного регулятора PD-L1.
5. Нейтрофилы селезенки мышей-опухоленосителей с большим размером опухолевого узла отличаются повышенной склонностью к спонтанному нетозу и увеличению степени его активации в ответ на стимуляторы нетоза. Применение противоопухолевого агента (ДНКазы I) приводит к снижению способности нейтрофилов к выбросу NET.

Научная новизна полученных результатов

Впервые были предложены референсные гены для исследования нейтрофилов мыши методом RT-qPCR – *Tbp* и *Hprt1*. Показано, что эти гены стабильно экспрессируются в наивных незрелых нейтрофилах костного мозга и зрелых нейтрофилах селезенки здоровых мышей и мышей с разными типами опухолей вне зависимости от статуса активации клеток.

Впервые описан фенотип опухоль-ассоциированных нейтрофилов селезенки мышей с устойчивой к цитостатикам лимфосаркомой RLS₄₀, карциномой легких Льюис и меланомой B16, а также их способность к нетозу. Показана связь между фенотипом опухоль-ассоциированных нейтрофилов и размером опухолевого узла на модели RLS₄₀: в селезенке мышей с опухолью большого размера присутствует популяция нейтрофилов с фенотипом, близким к классическому проопухолевому фенотипу, а нейтрофилы противоопухолевого фенотипа встречаются в селезенке мышей с замедленным ростом опухолей.

Впервые показано, что ДНКазы I вызывает значительную модификацию фенотипа нейтрофилов за счет снижения иммуносупрессивных маркеров (*Il10*, *Ccl17*, мРНК) и повышения противоопухолевого маркера FAS и иммунного регулятора PD-L1. Показано, что введение ДНКазы I животным-опухоленосителям подавляет способность опухоль-ассоциированных нейтрофилов к нетозу.

Практическая значимость

Автором выявлен ряд устойчивых проопухолевых маркеров нейтрофилов селезенки на различных опухолевых моделях (*Il10*, *Ccl17*). Эти маркеры могут быть адаптированы для прогнозирования течения заболевания у онкологических больных, а также могут быть использованы в качестве мишеней для иммуностимулирующей адъювантной терапии рака.

Выявлен иммуностимулирующий потенциал ДНКазы I и его влияние на фенотип нейтрофилов, что позволяет рассматривать ДНКазу I как перспективный препарат противоопухолевой терапии человека.

Методология и методы исследования

В работе применялись стандартные методы выделения клеток (центрифугирование в градиенте плотности, методы иммуномагнитной положительной и отрицательной селекции), метод проточной цитофлуориметрии, метод конфокальной микроскопии, спектрофотометрический метод определения уровня активных форм кислорода (ROS), стандартные методы выделения РНК, PCR в реальном времени. В работе использовали стандартные методы работы с культурами клеток *in vitro* и с опухолевыми моделями на мышах *in vivo* в соответствии с этическими протоколами.

Апробация работы и публикации

По материалам работы опубликовано 4 печатных работы в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и

Scopus. Результаты работы были представлены на 9 российских и международных конференциях.

Личный вклад соискателя

Экспериментальные данные, представленные в данной работе, были получены лично соискателем или при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку данных, оформление результатов и их публикацию. Планирование экспериментов и обсуждение результатов проведено под руководством д.б.н. Мироновой Н.Л. и к.б.н. Алексеевой Л.А. (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Работы с мышинными опухолевыми моделями выполнены совместно с к.б.н. Алексеевой Л.А., к.м.н. Сеньковой А.В. и к.м.н. Савиным И.А. (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Анализ флуоресцентной конфокальной микроскопии был проведен совместно с к.б.н. Марковым О.В. (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Гистологический анализ выполнен к.м.н. Сеньковой А.В. (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 144 страницах, включает 21 рисунка, 13 таблиц и 1 приложение. Список литературы содержит 387 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Получение и характеристика нейтрофилов селезенки мыши

1.1 Поиск и оптимизация протоколов для выделения нейтрофилов селезенки мышей

Для выделения нейтрофилов человека и нейтрофилов костного мозга (КМ) мыши существуют оптимальные протоколы, позволяющие получить популяцию нейтрофилов с высокой чистотой и жизнеспособностью, тем не менее существующие протоколы не позволяют получить нейтрофилы надлежащего качества из селезенки мыши. Поэтому на первом этапе исследования был проведен скрининг методов и модификация протоколов для выбора оптимального способа получения жизнеспособных и функциональных нейтрофилов селезенки мыши (Рис. 1).

Выделение нейтрофилов в градиенте плотности проводилось с использованием двухслойного раствора на основе фиколла 1.077/1.119 г/мл (протокол 2СФ) или трехслойного раствора на основе фиколла 1.083/1.090/1.110 г/мл (протокол 3СФ) (Рис. 1, Б). Также нами было проведено сравнение иммуномагнитных методов для выделения нейтрофилов: метод отрицательной иммуномагнитной селекции нейтрофилов с использованием набора EasySep™ Mouse Neutrophil Enrichment Kit (протокол ИНС) и метод положительной иммуномагнитной селекции нейтрофилов с использованием Dynabeads (протокол ИПС) (Рис. 1, В).

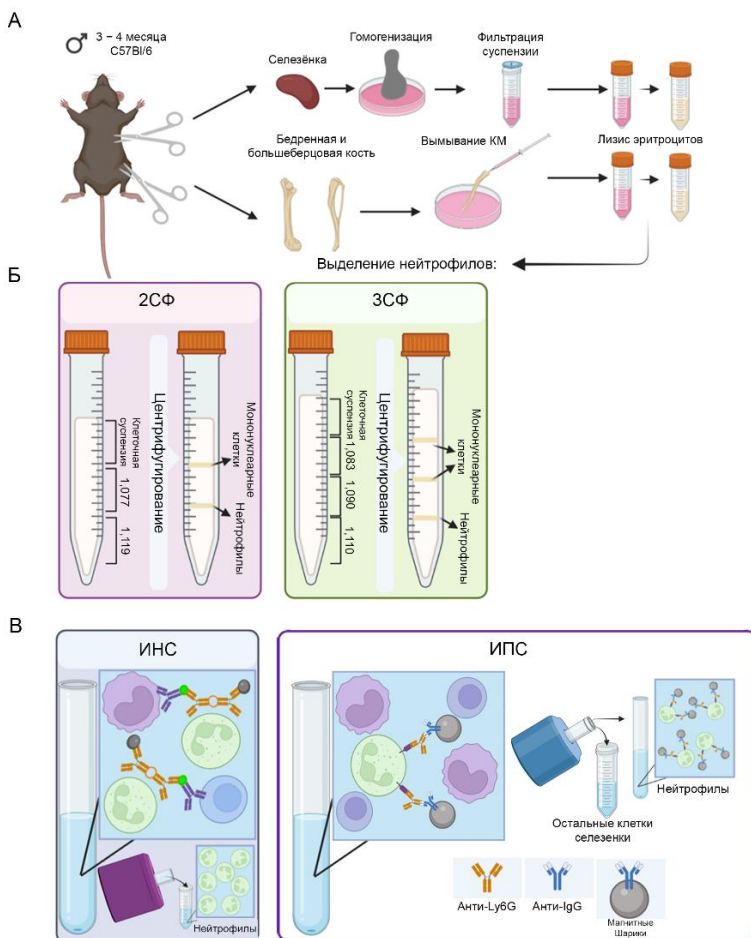


Рисунок 1. Схема различных протоколов выделения нейтрофилов из костного мозга и селезенки мышей, использованных в исследовании.

А. Приготовление суспензии клеток костного мозга и селезенки.

Б. Протоколы с использованием градиента плотности фикола.

В. Иммуномагнитные протоколы.

Показано, что протоколы центрифугирования на фиколле не подходят для выделения нейтрофилов из селезенки: чистота образца составила всего 10% (Таблица 1). Протокол ИНС позволил получить нейтрофилы с чистотой $48.6 \pm 4.3\%$ (Таблица 1). Протокол ИПС был наиболее эффективным: выделенные с его помощью нейтрофилы имели чистоту $98.7 \pm 0.5\%$ (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристика образцов, выделенных из селезенки здоровых мышей C57BL/6 с использованием разных протоколов.

Метод выделения	Чистота, %	Жизнеспособность, %	Выход клеток в образце, $\times 10^6$	Выход нейтрофилов, $\times 10^6$
2СФ	8.6 ± 1.2	74.0 ± 7.0	18.1 ± 1.9	1.5 ± 0.3
3СФ	10.5 ± 1.7	86.0 ± 4.0	0.8 ± 0.1	0.1 ± 0.02
ИНС	48.6 ± 4.3	89.6 ± 2.0	6.5 ± 2.4	3.3 ± 1.5
ИПС	98.7 ± 0.5	88.5 ± 4.5	0.7 ± 0.25	0.69 ± 0.25

1.2 Оценка функциональной активности выделенных нейтрофилов селезенки мышей

Иммуномагнитные методы положительной селекции могут влиять на функциональность выделенных клеток, поскольку магнитные частицы связываются с белками клеточной мембраны, играющими роль в функционировании клеток, поэтому была изучена способность продуцировать NET и ROS у нейтрофилов селезенки, выделенных по протоколу ИПС.

Для проверки способности формировать NET нейтрофилы селезенки обрабатывали 100 мкг/мл LPS, 50 или 500 нМ РМА, или 5 мкМ ионофора Ca^{2+} A23187 в течение 3 ч. Данные анализировали с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 2), и были выявлены изменения в морфологии нейтрофилов в контрольных образцах без стимуляции, что подтвердило тот факт, что нейтрофилы, выделенные по протоколу ИПС, могут активироваться (Рис. 2, А). Обработка нейтрофилов селезенки LPS, РМА и A23187 привела к образованию нитевидных или облакоподобных NET (Рис. 2, 3).

На рисунке 3 приведены данные конфокальной микроскопии как процент нейтрофилов, продуцирующих NET. Не было выявлено увеличения образования NET под действием LPS по сравнению с контролем (Рис. 3). РМА и A23187 вызывали увеличение процента нейтрофилов, образующих NET до 20 – 24% и 39%, соответственно, по сравнению с 10% в контроле (Рис. 3).

Нейтрофилы селезенки, выделенные с использованием ИПС, и нейтрофилы КМ, выделенные с использованием протокола 2СФ, инкубировали с 10 мкМ DCFDA при 37°C в течение 30 мин и активировали 5 мкМ A23187. Интенсивность накопления ROS определяли по интенсивности накопления флуоресценции (Рис. 4). Исходный уровень ROS в нативных нейтрофилах селезенки оказался в 2 – 2.5 раза выше, чем в нативных нейтрофилах КМ (Рис. 4), что может отражать тот факт, что часть нейтрофилов селезенки активированы. После стимуляции A23187 нейтрофилы КМ и селезенки продуцировали повышенное количество ROS, что говорит о сохранении функциональной активности выделенных нейтрофилов (Рис. 4).

Таким образом, наиболее оптимальным для выделения нейтрофилов селезенки оказался протокол ИПС, с помощью которого удалось выделить нейтрофилы селезенки не только высокой чистоты, но и с сохранением функциональной активности.

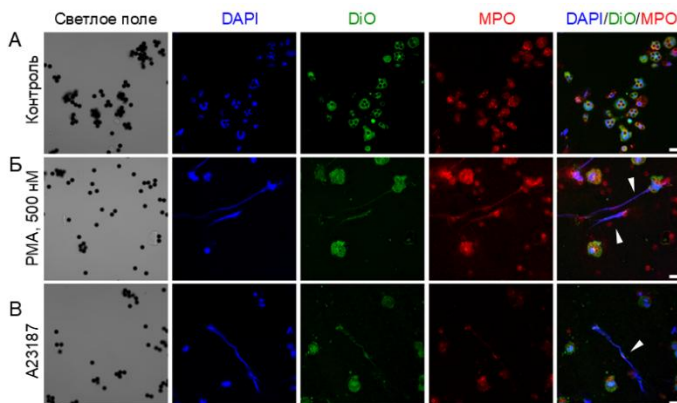


Рисунок 2. Формирование NET нейтрофилами селезенки, выделенными по протоколу ИПС. А. Нестимулированные нейтрофилы. Б. Нейтрофилы, стимулированные 500 нМ PMA. В. Нейтрофилы, стимулированные 5 мкМ A23187. DAPI – синий сигнал, ядра, DiOC6 – зеленый сигнал, мембраны, анти-MPO – красный сигнал, миелопероксидаза. Масштаб: 10 мкм. Наконечники стрелок указывают на NET. Изображения в светлом поле показывают положение магнитных шариков. Изображения были получены с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии.

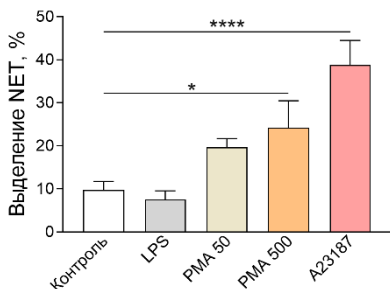


Рисунок 3. Процент нейтрофилов селезенки, формирующих NET в ответ на различные стимуляторы. Клетки стимулировались 100 мкг/мл LPS, 50 и 500 нМ PMA и 5 мкМ A23187 в течение 3 ч. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM. Использовался ANOVA с критерием множественных сравнений Тьюки. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

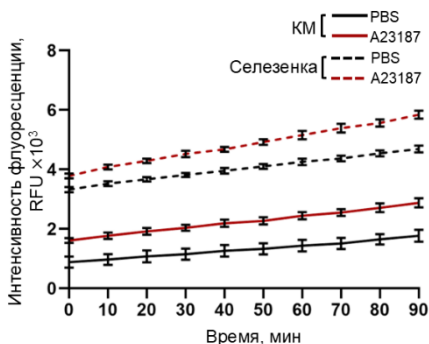


Рисунок 4. Продукция ROS нейтрофилами костного мозга и селезенки при стимуляции ионофором кальция A23187. Нейтрофилы костного мозга и селезенки мыши были обработаны 10 мкМ диацетата DCFDA и активированы 5 мкМ A23187. В качестве контроля использовали нативные нейтрофилы без стимуляции. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SD.

2. Выявление стабильно-экспрессируемых референсных генов в нейтрофилах мыши для исследования их фенотипа методом RT-qPCR

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) является одним из наиболее широко используемых методов изучения экспрессии генов. В относительной количественной оценке, которая обычно используется в RT-qPCR, экспрессия контрольного гена, называемого референсным геном, используется для нормализации экспрессии целевых генов. Референсные гены – это гены, которые имеют стабильную экспрессию без вариаций (или с минимальными вариациями) в исследуемом наборе образцов. В настоящее время общепринятым является тот факт, что различные методы лечения, экспериментальные условия или физиологические процессы могут влиять на экспрессию референсных генов, что приводит к неправильной интерпретации результатов RT-qPCR.

Вопрос выбора референсного гена особенно важен для нейтрофилов, поскольку нейтрофилы могут активно изменять свой транскриптом в ответ на незначительные сигналы окружающей среды. Более того, поскольку нейтрофилы селезенки при развитии опухоли активируются в отличие от нейтрофилов костного мозга, и при активации клеток экспрессия не всех референсных генов остается стабильной, важно выбрать референсный ген, экспрессия которого стабильна в наивных или покоящихся нейтрофилах и по-прежнему стабильна в активированных нейтрофилах селезенки. Таким образом, одной из задач нашего исследования было выявление подходящего референсного гена(ов), который можно было бы использовать для нейтрофилов мыши независимо от их активационного статуса.

Экспрессия 10 выбранных референсных генов была оценена в нейтрофилах, полученных из костного мозга и селезенки здоровых мышей C57Bl (n=3) и CBA (n=3), а также в нейтрофилах, полученных из селезенки мышей с опухолями различного гистологического генеза и путями метастазирования, карциномой легких Льюис LLC (n=3), лекарственно-устойчивой лимфосаркомой RLS₄₀^{Low} (размер опухоли менее 0.1 см³) (n=3) и RLS₄₀^{High} (размер опухоли более 1 см³) (n=3). Для изучения стабильности экспрессии выбранных референсных генов использовали следующие биоинформатические инструменты и методы: BestKeeper, NormFinder, geNorm и метод ΔCt . Для создания финального общего рейтинга использовали RefFinder (Таблица 2).

Используя различные алгоритмы, среди 10 исследованных референсных генов *Tbp* и *Hprt1* были выявлены как оптимальные референсные гены для характеристики нейтрофилов мыши методом RT-qPCR (Таблица 2). Экспрессия *Tbp* и *Hprt1* является стабильной в нейтрофилах мышей вне зависимости от их активации или источника.

Таблица 2. Общий рейтинг референсных генов в соответствии с использованными алгоритмами (BestKeeper, NormFinder, метод ΔCt и geNorm) и финальный рейтинг, рассчитанный RefFinder.

Рейтинг [§]	BestKeeper	NormFinder	ΔCt	geNorm	RefFinder
1	<i>Hprt1</i>	<i>Tbp</i>	<i>Tbp</i>	<i>Ywhaz/Tbp</i>	<i>Tbp</i>
2	<i>B2m</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Hprt1</i>		<i>Hprt1</i>
3	<i>Tbp</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Ywhaz</i>	<i>Actb</i>	<i>Ywhaz</i>
4	<i>Actb</i>	<i>Ywhaz</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Gapdh</i>	<i>B2m</i>
5	<i>Gapdh</i>	<i>Actb</i>	<i>B2m</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>
6	<i>Rack1</i>	<i>Eef2</i>	<i>Actb</i>	<i>B2m</i>	<i>Actb</i>
7	<i>Ywhaz</i>	<i>Sdha</i>	<i>Sdha</i>	<i>Sdha</i>	<i>Sdha</i>
8	<i>Eef2</i>	<i>B2m</i>	<i>Eef2</i>	<i>Eef2</i>	<i>Eef2</i>
9	<i>Rpl13a</i>	<i>Rpl13a</i>	<i>Rpl13a</i>	<i>Rpl13a</i>	<i>Rack1</i>
10	<i>Sdha</i>	<i>Rack1</i>	<i>Rack1</i>	<i>Rack1</i>	<i>Rpl13a</i>

[§] от наиболее стабильно-экспрессируемого к наименее стабильно-экспрессируемому

3. Фенотип нейтрофилов селезенки мышей с различными типами опухолей

3.1 Опухолевые модели

В работе использовали три типа опухолевых моделей: карцинома легких Льюис (LLC), лекарственно-устойчивая лимфосаркома RLS₄₀ и меланома B16. Клетки LLC и RLS₄₀ (10^6 кл. в 0.1 мл PBS) имплантировали внутримышечно мышам C57Bl/1 и CBA, соответственно; клетки B16 (10^5 кл. в 0.1 мл PBS) имплантировали подкожно в холку мышам C57Bl/6. На 15-й день для LLC и на 21-й день для опухолей B16 и RLS₄₀ измеряли размеры опухолей, собирали селезенки для выделения нейтрофилов, а также легкие (в случае LLC) и печень (в случае RLS₄₀) для гистологического анализа.

На 21-ый день роста опухоли мышцы с RLS₄₀ были разделены на подгруппы по размеру опухоли: RLS₄₀^{Low} (опухолевый узел менее 0.1 см³), RLS₄₀^{Med} (опухолевый узел более 0.1 см³, но менее 1 см³) и RLS₄₀^{High} (опухолевый узел более 1 см³). Аналогично, мышцы с B16 были разделены на подгруппы: B16^{Low} (опухолевый узел менее 0.1 см³) и B16^{High} (опухолевый узел более 1 см³). Для характеристики опухоль-ассоциированных нейтрофилов мышей с LLC, B16 и RLS₄₀ нейтрофилы селезенки были выделены методом иммуномагнитной положительной селекции и охарактеризованы с помощью проточной цитометрии и RT-qPCR.

3.2 Фенотип нейтрофилов селезенки мышей с LLC

При развитии LLC наиболее значительно происходило увеличение процента нейтрофилов селезенки, экспрессирующих PD-L1 на своей поверхности, до $11.7 \pm 0.8\%$ по сравнению с нейтрофилами селезенки (здоровый контроль) (Рис. 5, А). Этот результат согласуется с данными RT-

qPCR, где уровень мРНК *Cd274* (*Pd-11*) увеличивался 23-кратно по сравнению со здоровым контролем (Рис. 5, Г).

Более того, при развитии LLC наблюдали увеличение уровня мРНК *Il10* в 78 раз и уровня мРНК *Icam1* в 26 раз по сравнению с нейтрофилами КМ (Рис. 5, В). При этом популяция ICAM-1⁺ нейтрофилов возрастала незначительно по сравнению с нейтрофилами КМ и селезенки (С) здоровых мышей (Рис. 5, А).

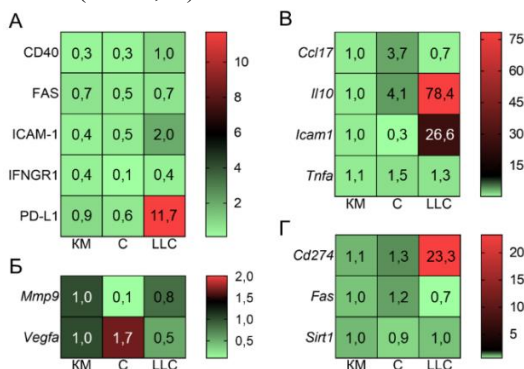


Рисунок 5. Фенотип нейтрофилов мышей с LLC. **А.** Тепловая карта данных проточной цитометрии. Результаты представлены как % от популяции нейтрофилов Ly6G⁺. Относительный уровень мРНК проангиогенных и регенеративных маркеров (**Б**), воспалительных маркеров (**В**), маркеров, связанных с апоптозом/некрозом (**Г**).

3.3 Фенотип нейтрофилов селезенки мышей с B16

Анализ нейтрофилов селезенки мышей с B16 показал, что максимальное увеличение популяций нейтрофилов CD40⁺, FAS⁺, ICAM-1⁺, IFN γ R1⁺ и PD-L1⁺ относительно селезенки здоровых животных наблюдается в подгруппе B16^{Low} (Рис. 6, А).

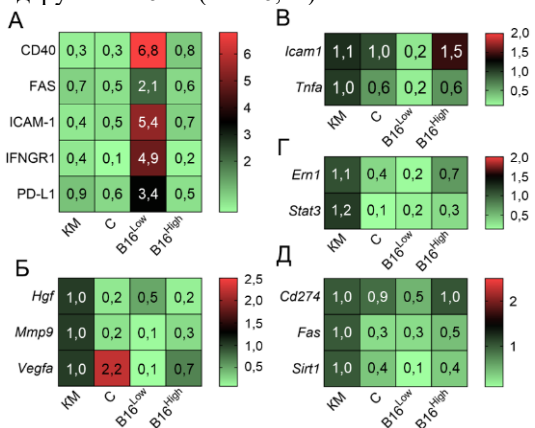


Рисунок 6. Фенотип нейтрофилов мышей B16 в сравнении с фенотипом нейтрофилов костного мозга (KM) и селезенки (С) здоровых мышей. **А.** Тепловая карта результатов проточной цитометрии. Результаты представлены как % от популяции нейтрофилов Ly6G⁺. Относительный уровень мРНК проангиогенных и регенеративных маркеров (**Б**), воспалительных маркеров (**В**), генов-участников путей передачи сигналов (**Г**) и маркеров, связанных с апоптозом/некрозом (**Д**).

В подгруппе B16^{Low} наиболее сильно увеличивалась представленность популяции IFN γ R1⁺ нейтрофилов ($4.9 \pm 0.2\%$ vs $0.1 \pm 0.03\%$), CD40⁺ нейтрофилов ($6.8 \pm 0.1\%$ vs $0.3 \pm 0.02\%$) и ICAM-1⁺ нейтрофилов ($5.4 \pm 0.04\%$ vs $0.5 \pm 0.03\%$) по сравнению с нейтрофилами селезенки здоровых животных (Рис. 6, А). Также происходило увеличение FAS⁺ популяции нейтрофилов ($2.1 \pm 0.02\%$ vs $0.5 \pm 0.02\%$) и PD-L1⁺ нейтрофилов (3.4 ± 0.1 vs $0.6 \pm 0.02\%$) (Рис. 6, А). Однако в подгруппе B16^{High} достоверного увеличения относительно костного мозга и селезенки здоровых животных не обнаружилось. По данным RT-qPCR уровень мРНК большинства изученных маркеров незначительно снижался в обеих подгруппах либо не изменялся по сравнению со здоровыми животными (Рис. 6, Б – Д).

3.4 Фенотип нейтрофилов селезенки мышей с RLS₄₀

В отличие от других опухолевых моделей, у нейтрофилов селезенки мышей с RLS₄₀ по результатам проточной цитометрии было обнаружено изменение маркеров, связанных с клеточной гибелью – PD-L1 и FAS, и только в подгруппах со сниженным опухолевым ростом RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med}. В подгруппе RLS₄₀^{Low} популяция FAS⁺ нейтрофилов увеличивалась в 30 раз относительно нейтрофилов селезенки здорового контроля ($20.6 \pm 1.9\%$ vs $0.7 \pm 0.1\%$), тогда как в группах RLS₄₀^{Med} и RLS₄₀^{High} была такого же уровня, как у нейтрофилов селезенки здорового контроля (Рис. 7, А). Однако уровень мРНК *Fas* в группе RLS₄₀^{Low} не отличался от его уровня в здоровом контроле (Рис. 7, Д).

Наиболее интересное наблюдение было сделано в отношении экспрессии PD-L1, где наблюдалось увеличение популяции PD-L1⁺ нейтрофилов, а также изменялся уровень мРНК *Cd274* в зависимости от размера опухоли. В подгруппах RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med} популяция PD-L1⁺ возросла примерно в 20 раз ($7.8 \pm 0.02\%$ и $7.6 \pm 0.2\%$, $C=0.4 \pm 0.1\%$), при этом такое увеличение популяции PD-L1⁺ в подгруппе RLS₄₀^{High} не наблюдалось (Рис. 7, А). Полученные данные коррелировали с данными RT-qPCR, которые показали в подгруппах RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med} повышение уровня мРНК *Cd274* (*Pd-l1*) примерно в 5 раз (25.0 ± 4.3 и 23.7 ± 1.2 , $C=4.4 \pm 0.5$) (Рис. 7, Д).

Уровень мРНК *Icam1* был увеличен в 10 раз в подгруппе RLS₄₀^{Low} и в 5 раз в подгруппе RLS₄₀^{High} относительно нейтрофилов КМ здорового контроля (9.9 ± 2.1 и 5.0 ± 1.8 -кратное изменение, соответственно). Однако анализ с помощью проточной цитометрии не выявил изменений популяции ICAM-1⁺ нейтрофилов в подгруппах (Рис. 7, А). При анализе противовоспалительных проопухолевых факторов обнаружилось, что в подгруппах RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med} уровень мРНК *Il10* вырос в 4 раза относительно уровня здоровых животных (4.1 ± 0.9 и 4.2 ± 0.01) и достоверно не изменился в группе RLS₄₀^{High} (Рис. 7, В).

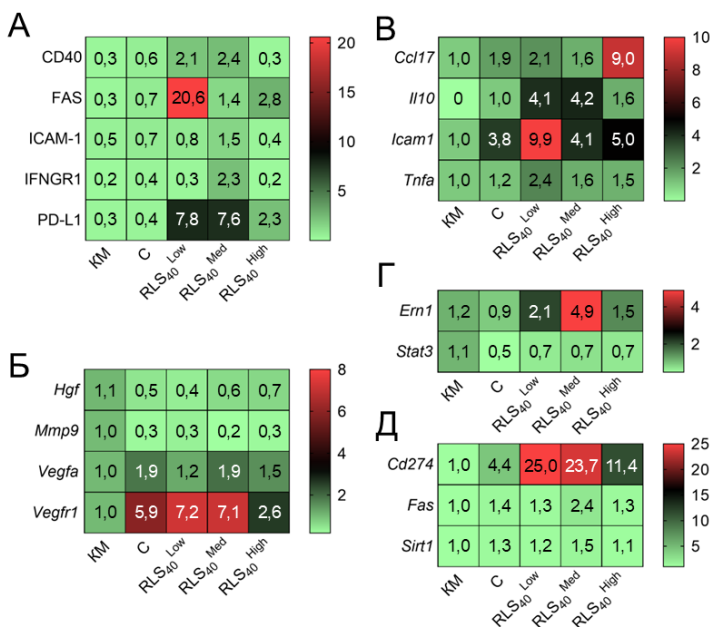


Рисунок 7. Фенотип нейтрофилов мышей с RLS₄₀. **А.** Тепловая карта результатов проточной цитометрии. Результаты представлены как % от популяции нейтрофилов Lyb6⁺. Относительный уровень мРНК проангиогенных и регенеративных маркеров (**Б**), воспалительных маркеров (**В**), генов-участников путей передачи сигналов (**Г**) и маркеров, связанных с апоптозом/нетозом (**Д**). Повышение и снижение экспрессии белковых маркеров или уровня мРНК показано диапазоном красного и зеленого цветов, соответственно. Контроли: KM – нейтрофилы костного мозга, C – нейтрофилы селезенки здоровых мышей CBA. RLS₄₀^{Low} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS₄₀ с опухолевым узлом размером менее 0.1 см³, RLS₄₀^{Med} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS₄₀ с опухолевым узлом размером более 0.1 см³ и менее 1 см³, RLS₄₀^{High} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS₄₀ с опухолевым узлом размером более 1 см³.

4. Влияние ДНКазы I на фенотип нейтрофилов при подавлении роста опухолей и метастазов у мышей с RLS₄₀ и B16

Представлялось интересным оценить влияние терапии агентом, эффективно снижающим рост опухоли и подавляющим метастазирование у мышей-опухоленосителей. В качестве такого агента была выбрана панкреатическая ДНКазы I быка, для которой ранее было показано противоопухолевое и антиметастатическое действие на различных моделях опухолей у мышей. Далее оценивали иммунный статус нейтрофилов селезенки после терапии ДНКазой I. Клетки RLS₄₀ имплантировали в/м (10⁶ кл., 0.1 мл) мышам линии CBA, клетки B16 имплантировали п/к (10⁵ кл., 0.1 мл) мышам линии C57Bl. Начиная с 4-го дня, животные получали в/м физ. раствор или

ДНКазу I (100 ед/мышь) ежедневно по схеме (5+2, 5 дней инъекции, 2 дня перерыв). Схема эксперимента представлена на Рисунке 8, А.

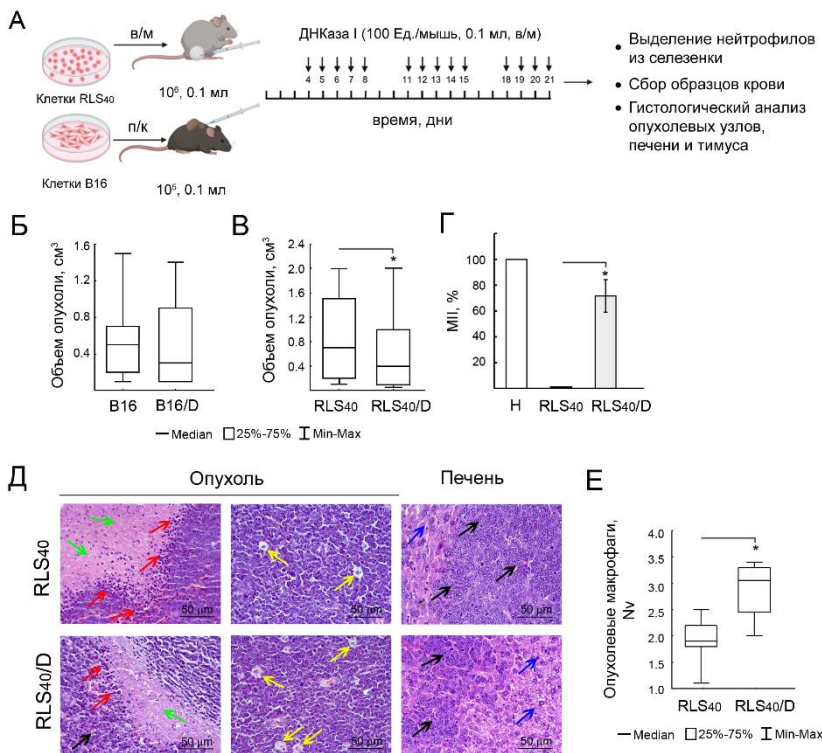


Рисунок 8. Влияние ДНКазы I на рост опухолей RLS40 и B16 и развитие метастазов. **А.** Схема эксперимента. **Б** и **В.** Объем опухолей у мышей с B16 и RLS40 соответственно. Данные представлены в виде медианы. Данные были статистически проанализированы с использованием t теста. * $p < 0.05$. **Г.** Метастазы в печени мышей с RLS40. МИ (индекс ингибирования метастазов) = $\frac{[\text{средняя площадь метастазов}_{\text{контроль}} - \text{средняя площадь метастазов}_{\text{эксперимент}}]}{\text{средняя площадь метастазов}_{\text{контроль}}} \times 100\%$. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM. Данные были статистически проанализированы с использованием t теста. * $p < 0.05$. **Д.** Репрезентативные гистологические изображения первичных опухолевых узлов и метастазов в печени мышей с RLS40, которым вводили физ. раствор или ДНКазу I. Окраска гематоксилином и эозином. Исходное увеличение $\times 400$. Черные стрелки указывают на опухолевую ткань первичных опухолевых узлов и метастазов в печени, зеленые стрелки указывают на некротический распад, красные стрелки указывают на клеточную инфильтрацию, желтые стрелки указывают на опухолевые макрофаги, а синие стрелки указывают на ткань печени. **Е.** Численная плотность (Nv) макрофагов в опухолевой ткани первичных опухолевых узлов. Данные были статистически проанализированы с использованием t теста. * $p < 0.05$

На Рис. 8 Б и В представлено изменение размеров первичных опухолевых узлов у мышей под действием ДНКазы I. Как видно из представленных данных, введение ДНКазы I не оказало достоверного влияния на размер опухолевого узла В16, но при этом отмечено снижение медианного значения размера опухоли в два раза (Рис. 8, Б).

На модели RLS₄₀ был продемонстрирован эффективный противоопухолевый эффект ДНКазы I: было показано достоверное 2-кратное снижение объема опухолевых узлов (Рис. 8, В). Более того, ДНКазы I продемонстрировала достоверный антиметастатический эффект: индекс ингибирования метастазирования (МИ) был снижен в группе мышей с RLS₄₀, получавших инъекции ДНКазы I, по сравнению с контролем (Рис. 8, Г).

4.1 Влияние ДНКазы I на фенотип нейтрофилов селезенки мышей с RLS₄₀

Эффект влияния ДНКазы I на фенотип нейтрофилов селезенки представлена на Рисунке 9.

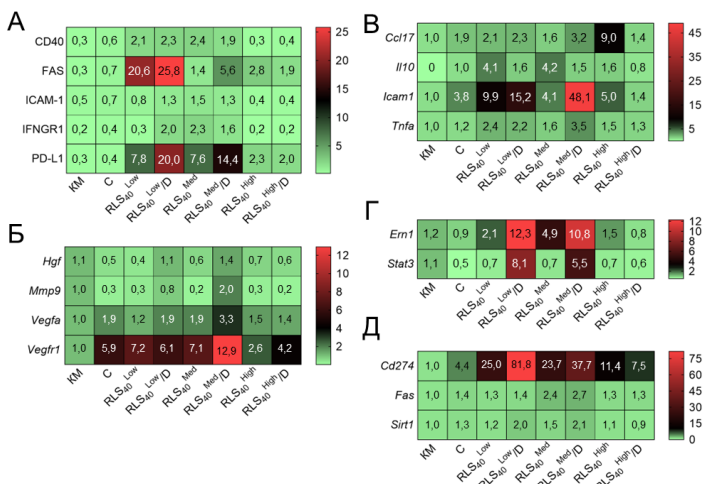


Рисунок 9. Фенотип нейтрофилов мышей с RLS₄₀, получавших инъекции физраствора и ДНКазы I. **А.** Тепловая карта данных проточной цитометрии. Результаты представлены как % от популяции нейтрофилов Ly6G⁺. Относительный уровень мРНК проангиогенных и регенеративных маркеров (**Б**), воспалительных маркеров (**В**), генов-участников путей передачи сигналов (**Г**) и маркеров, связанных с апоптозом/некрозом (**Д**). Повышение и снижение экспрессии белковых маркеров и уровня мРНК показано диапазоном красного и зеленого цветов, соответственно. Контроли: KM – нейтрофилы костного мозга, C – нейтрофилы селезенки здоровых мышей CBA. RLS₄₀^{Low} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS₄₀ с опухолевым узлом размером менее 0.1 см³, RLS₄₀^{Med} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS₄₀ с опухолевым узлом размером более 0.1 см³ и менее 1 см³, RLS₄₀^{High} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS₄₀ с опухолевым узлом размером более 1 см³. Группы RLS₄₀/D – мыши, получавшие ДНКазу I.

Введение ДНКазы I привело к увеличению уровня мРНК *Cd274 (Pd-11)*, который составил 81.8 ± 12.5 в подгруппе RLS_{40}^{Low}/D и 37.7 ± 1.3 в подгруппе RLS_{40}^{Med} , тогда как в подгруппе RLS_{40}^{High}/D такого эффекта не наблюдалось (Рис. 9, Д). Это увеличение экспрессии гена коррелировало с представленностью популяции $PD-L1^{+}$ нейтрофилов, которая увеличилась аналогичным образом. Введение ДНКазы I привело к 2 – 3-кратному увеличению популяции $PD-L1^{+}$ в подгруппах RLS_{40}^{Low}/D и RLS_{40}^{Med}/D по сравнению с соответствующей контрольной группой (RLS_{40}^{Low} и RLS_{40}^{Med}), однако в подгруппах RLS_{40}^{High}/D и RLS_{40}^{High} различий не было (Рис. 9, А).

Аналогичная тенденция наблюдалась и для популяции FAS^{+} нейтрофилов. Введение ДНКазы I, при снижении размера опухоли, приводило к увеличению популяции FAS^{+} до $25.8 \pm 8.9\%$ в подгруппе RLS_{40}^{Low}/D и до $5.6 \pm 1.5\%$ в подгруппе RLS_{40}^{Med}/D , а в подгруппе RLS_{40}^{High}/D изменений не было (Рис. 9, А). Однако, уровень мРНК *Fas* незначительно менялся во всех подгруппах, как контрольных, так и экспериментальных, по сравнению с нейтрофилами селезенки здоровых животных (Рис. 9, Д), что может быть связано с коротким временем жизни этой мРНК.

При введении ДНКазы I уровень мРНК *Icam1* повышался в подгруппах RLS_{40}^{Low}/D и RLS_{40}^{Med}/D (15.2 ± 2.8 и 48.1 ± 0.6 , соответственно), тогда как в подгруппе RLS_{40}^{High}/D изменений обнаружено не было (Рис. 9, В).

Среди противовоспалительных проопухолевых маркеров повышенный уровень мРНК *Ccl17* наблюдался только в подгруппе RLS_{40}^{High} , в то время как в подгруппах, получавших ДНКазу I, уровень мРНК *Ccl17* находился на уровне, наблюдаемом у здоровых животных (Рис. 9, В). Аналогичным образом, в подгруппах RLS_{40}^{Low} и RLS_{40}^{Med} уровень мРНК *Il10* был повышен в 4 раза по сравнению с нейтрофилами селезенки здоровых животных, введение ДНКазы снижало уровень мРНК *Il10* до уровня здоровых животных (Рис. 9, В) тогда как в подгруппах RLS_{40}^{High} и RLS_{40}^{High}/D был на уровне здорового контроля.

4.2 Влияние ДНКазы I на фенотип нейтрофилов селезенки мышей с B16

По данным проточной цитометрии в модели B16 наблюдали минимальные изменения (2 – 7%) популяции нейтрофилов, экспрессирующих исследуемые маркеры в подгруппах $B16^{Low}$ и $B16^{Low}/D$, независимо от введения ДНКазы I (Рис. 10, А). По данным RT-qPCR не наблюдается статически достоверных изменений в экспрессии изучаемых генов в результате введения ДНКазы I (Рис. 10, Б – Д).

5. Исследование способности опухоль-ассоциированных нейтрофилов к образованию нейтрофильных ловушек

Для изучения способности нейтрофилов к образованию NET использовали нейтрофилы селезенки мышей с RLS_{40} , получавших физраствор или ДНКазу I по схеме на Рис. 8, А. Индукцию NET у нейтрофилов исследовали под действием химического активатора A23187 (Рис. 11, А).

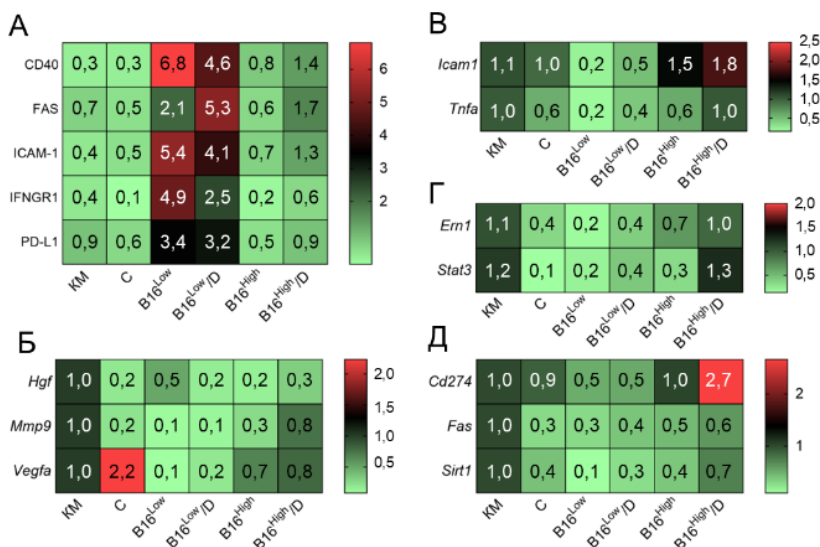


Рисунок 10. Фенотип нейтрофилов мышей с B16, получавших инъекции физраствора и ДНКазы I. **А.** Тепловая карта данных проточной цитометрии. Результаты представлены как % от популяции нейтрофилов Lyb6G⁺. Относительный уровень мРНК проангиогенных и регенеративных маркеров (**Б**), воспалительных маркеров (**В**), генов-участников путей передачи сигналов (**Г**) и маркеров, связанных с апоптозом/нетозом (**Д**). Контроли: KM – нейтрофилы костного мозга, C – нейтрофилы селезенки здоровых мышей C57Bl. B16^{Low} – нейтрофилы селезенки мышей с B16 с опухолевым узлом размером менее 0.1 см³, B16^{High} – нейтрофилы селезенки мышей с B16 с опухолевым узлом размером более 1 см³. Группы B16/D – мыши, получавшие ДНКазу I.

Из представленных данных видно, что нейтрофилы подгрупп RLS₄₀^{High}, как naive, так и стимулированные A23187, подвергаются нетозу, характеризующемуся образованием нитевидных или облакоподобных NET (панели DAPI и Merged, белые стрелки, Рис. 11, А).

Уровень спонтанного образования NET был повышен в подгруппах RLS₄₀^{High} и RLS₄₀^{High}/D по сравнению с подгруппой RLS₄₀^{Low}. Нейтрофилы из подгрупп RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Low}/D характеризовались наименьшим уровнем спонтанного нетоза (Рис. 11, Б). При стимуляции A23187 нейтрофилы во всех группах ответили на активацию и продемонстрировали более высокий уровень образования NET по сравнению со спонтанным нетозом (Рис. 11, В). Уровень стимулированного нетоза в нейтрофилах здоровых мышей и мышей подгрупп RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Low}/D был примерно одинаковым и составил 35% (Рис. 11, В). После стимуляции нейтрофилы мышей подгрупп RLS₄₀^{High} и RLS₄₀^{High}/D характеризовались более высоким уровнем образования NET по сравнению с другими группами: 48% (диапазон 36 – 74%) и 46% (диапазон 14 – 64%) в подгруппах RLS₄₀^{High} и RLS₄₀^{High}/D, соответственно (Рис. 11, В). Тем не менее,

нейтрофилы подгруппы RLS_{40}^{High}/D демонстрировали тенденцию к снижению нижней границы разброса значений нетоза, что указывает на снижение способности нейтрофилов образовывать NET под действием ДНКазы I (Рис. 11, Б и В).

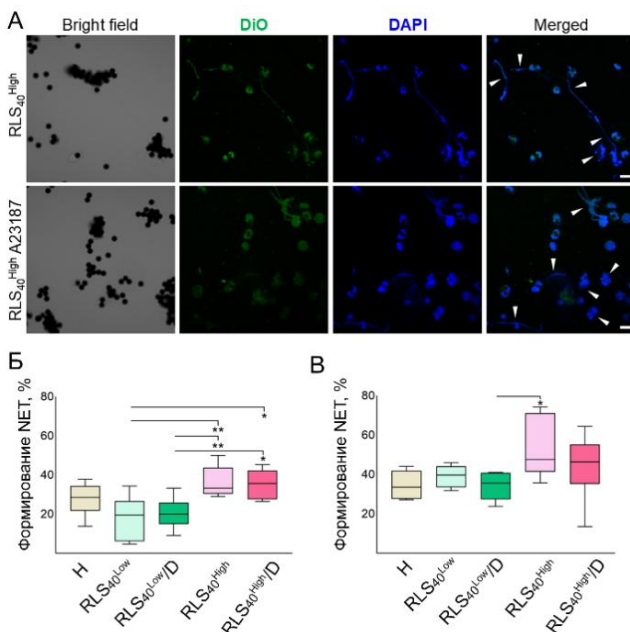


Рисунок 11. NET, образованные нейтрофилами селезенки мышей с RLS_{40} , получавших инъекции физраствора и ДНКазы I. **А.** Образование NET нейтрофилами подгрупп RLS_{40}^{High} в отсутствие и присутствии A23187. **Б.** Процент нейтрофилов, подвергшихся спонтанному нетозу. **В.** Процент нейтрофилов, подвергшихся нетозу при активации A23187. Данные конфокальной флуоресцентной микроскопии. Масштабная линейка 10 мкм. Белые стрелки указывают на NET. Статистический анализ выполнен с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с критерием множественных сравнений по Тьюки. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$. H – нейтрофилы селезенки здорового контроля. RLS_{40}^{Low} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS_{40} с опухолевым узлом размером менее 0.1 см³, RLS_{40}^{High} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS_{40} с опухолевым узлом размером более 1 см³. Группы RLS_{40}/D – мыши, получавшие ДНКазу I.

Таким образом, нейтрофилы из мышей с большими опухолями (группа RLS_{40}^{High}) обладают повышенной способностью к образованию NET как спонтанно, так и после стимуляции A23187. Тенденция к снижению образования NET из нейтрофилов, выделенных из мышей-опухоленосителей после терапии ДНКазой I, подтверждает восстановление противоопухолевого иммунного ответа.

6. Получение нейтрофилов противоопухолевого фенотипа

Для поляризации нейтрофилов *in vitro* использовали нейтрофилы костного мозга здоровых мышей. Нейтрофилы выделяли с помощью ИНС и подвергали поляризации с помощью смеси провоспалительных факторов LPS, IFN- γ и IFN- β (Рис. 12, А). Для поддержания жизнеспособности нейтрофилов в условиях *in vitro* в среду добавляли ингибитор апоптоза QVD-Qph. В качестве контроля использовали нейтрофилы, которые инкубировали с ингибитором апоптоза QVD-Qph (N0). После 24-часовой инкубации со стимуляторами методом проточной цитометрии оценивали фенотип поляризованных нейтрофилов (Рис. 12, Б). Около 80% поляризованных нейтрофилов экспрессировали FAS, PD-L1 и ICAM-1 на своей поверхности (Рис. 12, Б). Также наблюдалось умеренное повышение процента нейтрофилов, экспрессирующих CD40 и IFN γ R1 (до 10%) (Рис. 12, Б).

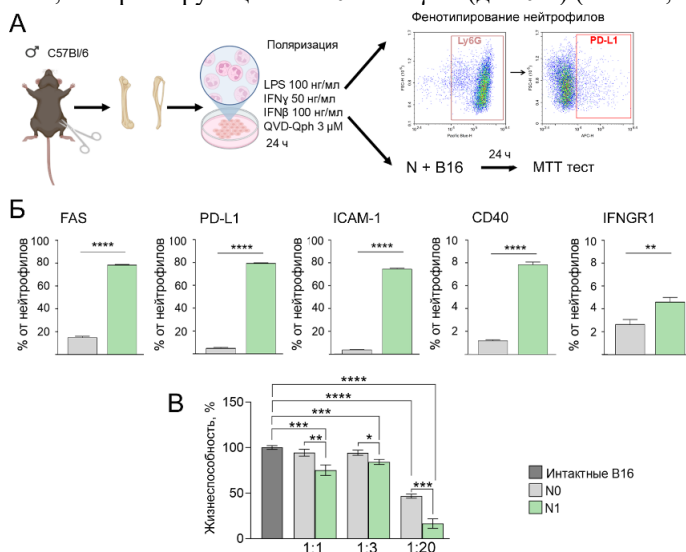


Рисунок 12. Получение и характеристика нейтрофилов с противоопухолевой активностью *in vitro*. **А.** Схема поляризации и ко-культивирования нейтрофилов со клетками B16. **Б.** Процент нейтрофилов, поляризованных *in vitro*, экспрессирующих на своей поверхности маркеры FAS, PD-L1, ICAM-1, CD40 и IFN γ R1. **В.** Влияние *in vitro* поляризованных в противоопухолевый фенотип нейтрофилов (N1) на жизнеспособность клеток B16 в сравнении с контрольными нейтрофилами (N0). К клеткам B16 нейтрофилы добавляли в соотношениях 1:1, 1:3 и 1:20 (B16: нейтрофилы). Результаты проточной цитометрии и МТТ-теста представлены в виде mean $\pm$ SEM. t-тест. * $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$; **** — $p < 0.0001$.

Поляризованные нейтрофилы были ко-культивированы с клетками меланомы B16 в течение 24 ч и далее анализ цитотоксичности нейтрофилов по отношению к опухолевым клеткам проводили с использованием МТТ-теста (Рис. 12, В). Как видно из представленных данных нейтрофилы N0 не

оказывали влияния на жизнеспособность опухолевых клеток при соотношении 1:1 и 1:3 (B16 : нейтрофилы) (Рис. 12, В). При инкубации клеток B16 с нейтрофилами N1 наблюдалось статистически значимое снижение жизнеспособности до $75 \pm 5.8\%$ и $84 \pm 2.9\%$ при соотношении 1:1 и 1:3, соответственно (Рис. 12, В). При высоком соотношении клеток (1:20) как N0, так и N1 нейтрофилы снижали жизнеспособность опухолевых клеток, однако N1 нейтрофилы оказывали более выраженное воздействие, снижая жизнеспособность до $17 \pm 5.2\%$, по сравнению с $47 \pm 2.2\%$ для N0 нейтрофилов (Рис. 11, В).

Таким образом, полученные нами нейтрофилы N1 демонстрируют противоопухолевую активность и могут служить моделью для дальнейшего изучения механизмов противоопухолевой функции нейтрофилов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование расширяет понимание функциональной гетерогенности нейтрофилов и их роли в опухолевом микроокружении.

С помощью иммуномагнитной селекции была выделена чистая фракция нейтрофилов из селезёнки мышей с сохранением их физиологической активности. Впервые в рамках данного исследования было установлено, что гены *Tbp* и *Hprt1* демонстрируют стабильную экспрессию в мышинных нейтрофилах, независимо от состояния иммунной активации.

На моделях LLC и RLS₄₀ обнаружена гетерогенность нейтрофильных популяций: в LLC повышена экспрессия *Il10* и *Cd274* (PD-L1), связанная с проопухолевым фенотипом, а в RLS₄₀ профиль TAN зависит от агрессивности опухоли: проопухолевые нейтрофилы преобладали у животных с крупными опухолями, тогда как противоопухолевые – у мышей с замедленным ростом новообразований, подтверждая пластичность нейтрофилов. Терапия ДНКазой I на модели RLS₄₀ стимулировала иммунитет, снижая иммуносупрессивный потенциал нейтрофилов, тогда как в B16 эффект был минимален, что подчёркивает важность учёта специфики опухолевой модели при разработке терапевтических стратегий. Выявлена склонность нейтрофилов у животных с большими опухолями к спонтанному нетозу и активации в ответ на стимуляторы. Введение ДНКазы I снижало способность нейтрофилов к образованию NET, что указывает на потенциал данного фермента в таргетировании нетоз-опосредованных механизмов в опухолевой патологии.

Таким образом, результаты исследования подчёркивают двойственную роль нейтрофилов и их потенциал как терапевтической мишени. Перспективы дальнейших исследований связаны углублённым изучением механизмов переключения нейтрофильных фенотипов и разработкой комбинированных стратегий, включающих ингибиторы нетоза и иммуностимуляторы, что может способствовать повышению эффективности противоопухолевой терапии и улучшению прогноза пациентов с онкологическими заболеваниями.

ВЫВОДЫ

1. Разработан протокол выделения нейтрофилов селезёнки на основе метода иммуномагнитной положительной селекции. Показано, что с использованием этого метода из селезенки мышей выделяется фракция нейтрофилов с сохранённой функциональной активностью с наибольшей чистотой и жизнеспособностью.
2. Впервые предложены референсные гены для исследования нейтрофилов мыши методом RT-qPCR – *Tbp* и *Hprt1*. Показано, что эти гены стабильно экспрессируются в наивных незрелых нейтрофилах костного мозга и зрелых нейтрофилах селезенки здоровых мышей и мышей с разными типами опухолей вне зависимости от статуса активации клеток.
3. На моделях опухолей разного гистогенеза показано, что фенотип нейтрофилов селезёнки зависит от стадии и типа опухоли:
 - При стабильной прогрессии карциномы легких Льюис LLC нейтрофилы селезенки мышей проявляют иммуносупрессивный проопухолевый фенотип с повышением уровня мРНК *Il10* и *Cd274*, а также белка PD-L1;
 - При развитии меланомы B16, характеризующейся низкой или практически отсутствующей иммуногенностью, изменения фенотипа нейтрофилов не наблюдается;
 - При развитии лимфосаркомы RLS₄₀, находящейся под давлением иммунной системы, фенотип нейтрофилов соотносится с агрессивностью опухоли: при агрессивном росте опухоли выявляются нейтрофилы иммуносупрессивного фенотипа, тогда как при подавлении роста опухоли наблюдаются нейтрофилы с противоопухолевым фенотипом.
4. Изучено изменение фенотипа нейтрофилов в селезенке мышей с лимфосаркомой RLS₄₀ и меланомой B16 при снижении инвазивного потенциала опухоли под действием противоопухолевого агента (бычьей панкреатической ДНКазы I). Показано, что:
 - Применение ДНКазы I у мышей с RLS₄₀ модифицирует профиль нейтрофилов путем снижения уровня мРНК иммуносупрессивных маркеров (*Il10*, *Ccl17*) и повышения экспрессии противоопухолевого маркера FAS и иммунного регулятора PD-L1;
 - Применение ДНКазы I мышам с B16 не приводит к изменению профиля нейтрофилов.
5. Показано, что нейтрофилы селезенки мышей-опухоленосителей с большим размером опухолевого узла отличаются повышенной склонностью к спонтанному нетозу и увеличению степени его активации в ответ на стимуляторы нетоза. Применение ДНКазы I приводит к снижению способности нейтрофилов к выбросу NET.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Sounbuli K.**, Mironova N., Alekseeva L. Diverse Neutrophil Functions in Cancer and Promising Neutrophil-Based Cancer Therapies // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, № 24. P. 15827. doi: 10.3390/ijms232415827
2. **Sounbuli K.**, Alekseeva L.A., Markov O. V., Mironova N.L. A Comparative Study of Different Protocols for Isolation of Murine Neutrophils from Bone Marrow and Spleen // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 24. P. 17273. doi: 10.3390/ijms242417273
3. **Sounbuli K.**, Alekseeva L.A., Sen'kova A. V., Savin I.A., Zenkova M.A., Mironova, N.L. *Tbp* and *Hprt1* Are Appropriate Reference Genes for Splenic Neutrophils Isolated from Healthy or Tumor-Bearing Mice // Biomedicines. 2024. Vol. 12, № 11. P. 2571. doi: 10.3390/biomedicines12112571
4. **Sounbuli K.**, Alekseeva L.A., Sen'kova A. V., Markov O. V., Savin I.A., Zenkova M.A., Mironova N.L. Neutrophils in Cancer: Phenotypic Heterogeneity Across Tumor Models and Significant Alteration of Splenic Neutrophil Phenotype in Lymphosarcoma RLS₄₀ Model Following DNase I Treatment // Cancers (Basel). 2025. Vol. 17, № 16. P. 2631. doi: 10.3390/cancers17162631

Работа была выполнена при поддержке грантами РФФ № 22–14-00289 и № 19–74-30011