

Российская Академия Наук
Сибирское Отделение
Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки
Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины

Министерство Науки и Высшего Образования Российской Федерации
Федеральное Государственное Автономное Образовательное Учреждение
Высшего Образования
«Новосибирский Национальный Исследовательский Государственный
Университет» (Новосибирский Государственный Университет, НГУ)

На правах рукописи

Сунбули Хетам

**Характеризация опухоль-ассоциированных нейтрофилов и
особенности их взаимодействия с опухолевыми клетками**

1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Алексеева Людмила Александровна

Новосибирск, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
Актуальность исследования	8
Цель и задачи исследования.....	9
Основные положения, выносимые на защиту	10
Научная новизна полученных результатов.....	11
Практическая значимость.....	11
Методология и методы исследования	11
Апробация работы и публикации	12
Личный вклад соискателя.....	13
Структура и объем диссертации	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Нейтрофилы: общая характеристика и функции	14
1.2. Опухоль-ассоциированные нейтрофилы	19
1.2.1. История изучения.....	19
1.2.2. Гетерогенность опухоль-ассоциированных нейтрофилов	21
1.2.3. Противоопухолевое действие нейтрофилов	27
1.2.4. Проопухолевое действие нейтрофилов.....	30
1.3. Нейтрофильные внеклеточные ловушки	31
1.3.1. История изучения.....	31
1.3.2. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в микроокружении опухоли.....	33
1.4. Нейтрофилы как мишень в терапии рака	35
1.4.1. Ингибирование привлечения нейтрофилов в микроокружение опухоли.....	35
1.4.2. Модулирование фенотипа нейтрофилов.....	36
1.4.3. NET как перспективная терапевтическая мишень.....	37

1.5. Заключение	41
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	42
2.1. МАТЕРИАЛЫ	42
2.1.1. Реактивы и препараты.....	42
2.1.2. Оборудование	43
2.1.3. Программное обеспечение	44
2.1.4. Буферы и растворы.....	44
2.1.5. Праймеры для PCR.....	45
2.1.6. Культуры клеток.....	46
2.1.7. Лабораторные животные и модели опухолей	47
2.2. МЕТОДЫ	47
2.2.1. Электрофорез в агарозном геле	47
2.2.2. Получение первичных культур клеток	47
2.2.3. Оценка жизнеспособности клеток.....	50
2.2.4. Проточная цитометрия	50
2.2.5. Визуализация NET с помощью конфокальной микроскопии.....	51
2.2.6. Оценки продукции ROS в нейтрофилах	52
2.2.7. Выделение РНК и приготовление кДНК	52
2.2.8. RT-qPCR.....	52
2.2.9. Опухолевые модели	53
2.2.10. Исследование изменения фенотипа нейтрофилов под действием ДНКазы I на различных моделях опухолей	56
2.2.11. Поляризация нейтрофилов in vitro	56
2.2.12. Влияние нейтрофилов на жизнеспособность клеток меланомы B16.....	57
2.2.13. Статистический анализ	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	58
3.1. Получение и характеристика нейтрофилов костного мозга и селезенки мыши	58
3.1.1. Поиск и оптимизация протоколов для выделения нейтрофилов костного мозга и селезенки	58

3.1.2. Характеристика нейтрофилов, выделенных из костного мозга и селезенки	59
3.1.3. Сравнение чистоты, жизнеспособности и выхода нейтрофилов, выделенных из костного мозга и селезенки с использованием различных протоколов.....	63
3.1.4. Оценка функциональной активности выделенных нейтрофилов селезенки мышей.....	64
3.1.5. Обсуждение и заключение	69
3.2. Выявление стабильно-экспрессируемых референсных генов в нейтрофилах мыши для исследования их фенотипа методом RT-qPCR	71
3.2.1. Обоснование выбора референсных генов для нейтрофилов.....	71
3.2.2. Опухолевые модели, использованные в работе	73
3.2.3. Профиль экспрессии референсных генов	74
3.2.4. Оценка стабильности экспрессии референсных генов.....	75
3.2.5. Обсуждение и заключение	78
3.3. Фенотип нейтрофилов селезенки мышей с различными типами опухолей.....	81
3.3.1. Опухолевые модели	81
3.3.2. Влияние типа опухоли на фенотип нейтрофилов	82
3.3.3. Обсуждение и заключение	87
3.4. Влияние ДНКазы I на фенотип нейтрофилов при подавлении роста опухолей и метастазов у мышей с RLS ₄₀ и B16	89
3.4.1. Опухолевые модели и схема лечения.....	89
3.4.2. Влияние ДНКазы I на рост опухолей и метастазов у мышей с RLS ₄₀ и B16	91
3.4.3. Анализ концентрации вДНК сыворотки крови и соотношения митохондриальной и ядерной ДНК.....	91
3.4.4. Изменения в иммунокомпетентных органах под влиянием ДНКазы I.....	93
3.4.5. Влияние ДНКазы I на фенотип нейтрофилов селезенки мышей с RLS ₄₀	94
3.4.6. Влияние ДНКазы I на фенотип нейтрофилов селезенки мышей с B16	97
3.4.7. Обсуждение и заключение	98
3.5. Исследование способности опухоль-ассоциированных нейтрофилов к образованию нейтрофильных ловушек.....	101
3.5.1. Изучение уровня нетоза нейтрофилов селезенки мышей с RLS ₄₀	101

3.5.2. Обсуждение и заключение	103
3.6. Получение нейтрофилов противоопухолевого фенотипа.....	104
3.6.1. Получение и характеристика нейтрофилов противоопухолевого фенотипа in vitro	104
3.6.2. Цитотоксичность нейтрофилов противоопухолевого фенотипа по отношению к клеткам меланомы B16	104
3.6.3. Обсуждение и заключение	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
ВЫВОДЫ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111
ПРИЛОЖЕНИЕ	131

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

внДНК – внеклеточная ДНК
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза – дезоксирибонуклеаза
ИНС – иммуномагнитная негативная селекция
ИПС – иммуномагнитная положительная селекция
КМ – костный мозг
ЛБ – лизирующий буфер
МС – магнитная сепарация
мтДНК – митохондриальная ДНК
ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки
ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
ядДНК – ядерная ДНК
AAV – аденоассоциированный вирусный вектор
ADCC – антителозависимая клеточная цитотоксичность
АКТ – протеинкиназа В
ARG – аргиназа
BPI – Белок, повышающий проницаемость бактерий
CAF – ассоциированные с раком фибробласты
CCL – лиганды хемокинов с мотивом C-C
CD – кластер дифференцировки
CXCL – лиганды хемокинов с мотивом C-X-C
CXCR – рецептор хемокинов типа C-X-C
CyTOF – масс-цитометрия
DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением тканей
EMT – эпителиально-мезенхимальный переход
FcR – Fc-рецептор
G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HDN – нейтрофилы высокой плотности
HCC – гепатоцеллюлярная карцинома
HGF – фактор роста гепатоцитов
HMGB1 – белок группы высокой подвижности В1
ICAM-1 – Молекула межклеточной адгезии-1
IFN – интерферон
IFN γ R1 – рецептор интерферона гамма 1
IL – интерлейкин
LDN – нейтрофилы низкой плотности
LPS – липополисахарид
MAC-1 – антиген макрофагов 1-го типа
MET – рецептор тирозинкиназы мезенхимально-эпителиального перехода
MMP – матриксная металлопротеиназа
MPO – миелопероксидаза
NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

NE – нейтрофильная эластаза
NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки
NF- κ B – ядерный фактор каппа-B
NLR – соотношение нейтрофилов к лимфоцитам
NK-клетки – естественные киллеры
NOX – NADPH оксидаза
PAD4 – пептидиларгининдеиминаза типа 4
PAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами
PCR – полимеразная цепная реакция
PD-1 – белок программируемой клеточной смерти 1
PD-L1 – лиганд программируемой клеточной смерти 1
PGE2 – простагландин E2
PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа
PMA – фобол миристанат ацетата
qPCR – количественная полимеразная цепная реакция
RNS – активные формы азота
ROS – активные формы кислорода
RT-qPCR – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
scRNA-seq – секвенирование нуклеотидных последовательностей единичных клеток
STAT3 – Сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции 3
TAM – опухоль-ассоциированные макрофаги
TAN – опухоль-ассоциированные нейтрофилы
TGF- β – трансформирующий фактор роста бета
TLR – толл-подобный рецептор
TNF- α – фактор некроза опухоли α
Treg – регуляторные T-клетки
VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста
VEGFR1 – рецептор VEGF 1

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Нейтрофилы представляют собой наиболее многочисленную популяцию циркулирующих лейкоцитов и опосредуют самые ранние фазы воспалительных реакций. Нейтрофилы долго воспринимались односторонне, как часть врожденной иммунной системы, первичный барьер широкого спектра действия на пути патогена. На протяжении почти всего прошлого века сохранялась именно эта концепция, 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 [1,2], так и при патологиях [3,4].

Впервые связь между воспалением и онкологическими заболеваниями была установлена Вирховым в 1863 году, когда он обнаружил лейкоциты в опухолевых тканях. В 1990-х годах появился термин "опухоль-ассоциированные нейтрофилы" (Tumor-associated neutrophils, TAN), и их роль в канцерогенезе стала активно обсуждаться. Однако, данные о функциях нейтрофилов при развитии опухоли были противоречивы [5–8]. Позднее было показано, что в опухолях могут встречаться TAN двух условных фенотипов: N1 (противоопухолевый) и N2 (проопухолевый). Впервые различие фенотипов TAN было описано Фридлендером и соавт. в 2009 году [9]. Было показано, что сами опухолевые клетки и клетки опухолевого микроокружения активно продуцируют TGF- β , что способствует поляризации нейтрофилов в N2 фенотип [9]. В ряде работ Яблонской с соавт. было показано, что IFN- β способствует поляризации нейтрофилов в N1 фенотип [10–12].

Описание фенотипов N1 и N2, в основном, основывается на типе воздействия нейтрофилов на клетки опухоли и опухолевого микроокружения. Поляризация нейтрофилов является сложным процессом, на который влияют ряд факторов, связанных с опухолью. В связи с этим накапливаются противоречивые выводы о влиянии нейтрофилов на опухоль [13,14]. Таким образом, изучение фенотипа и функционирования нейтрофилов при развитии опухолей является актуальным.

Для изучения фенотипа TAN в данной работе предлагается использовать нейтрофилы селезенки, так как они могут отражать функциональное состояние нейтрофилов, выполнивших свою роль в организме, и поступивших в селезенку для клиренса [15–19]. Хотя селезенка является преимущественно лимфоидным органом,

нейтрофилы также накапливаются в селезенке и, как полагают, играют важную роль при различных физиологических и патологических состояниях [20,21]. В отличие от нейтрофилов костного мозга, нейтрофилы селезенки характеризуются относительно высокой степенью зрелости с сохраненной функциональностью [22,23]. В целом, нейтрофилы селезенки являются хорошим отражением иммунного ответа организма при различных патологиях, особенно при развитии опухоли.

TAN способны формировать нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps, NET) в микроокружении опухоли [24], роль которых в прогрессировании опухоли остается невыясненной. NET представляют собой фибриновые структуры, состоящие из генетического материала нейтрофилов, белков и гранул, которые были впервые обнаружены Бринкманном и др. в 2004 г. [25]. NET формируются при специфической гибели нейтрофилов – нетозе [26], и могут способствовать метастазированию и росту опухоли [27–32], защищая опухоль и циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) от иммунной системы [33–35], а также разрушая внеклеточный матрикс и способствуя формированию преметастатической ниши [36,37]. Поэтому ингибирование нетоза или деградация NET рассматривается как перспективное направление терапии опухолевых заболеваний.

В многочисленных исследованиях показано, что у онкологических больных уровень внеклеточной ДНК (внДНК) в крови повышен, в том числе за счёт повышенного выброса NET нейтрофилами [38–40]. Повышение уровней внДНК и NET часто сопровождается снижением ДНКазной активности крови [40,41]. 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 [42–47], что подтверждено другими исследованиями [48–52].

Цель и задачи исследования

Целью нашего исследования являлась характеристика опухоль-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 опухоль-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 селезёнки 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 селезёнке 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 ДНКаза 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 печатные работы:

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 представлена на 9 российских и международных конференциях:

- Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 24–28 июля 2022 г).
- X, XI и XII Международная Конференция Молодых Ученых OPEN BIO (Новосибирск, 24–27 сентября 2023 г, 24–27 сентября 2024 г и 23–26 сентября 2025 г).
- Всероссийская конференция современные методы исследования в клеточной биологии и медицине (Орёл, 16–17 ноября 2023 г).
- Научная молодежная школа-конференция BioTop-2023: Достижения молодых ученых ИХБФМ (Новосибирск, 30 ноября – 1 декабря 2023 г).

- 77-я и 78-я Международная школа-конференция молодых ученых «БИОСИСТЕМЫ: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 15–19 апреля 2024 г и 14–18 апреля 2025 г).
- Всероссийский форум молодых исследователей ХимБиоSeasons (Калининград, 14–18 апреля 2025 г).

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Нейтрофилы: общая характеристика и функции

Нейтрофилы, также называемые полиморфноядерными лейкоцитами, являются самой многочисленной популяцией циркулирующих лейкоцитов и опосредуют самые ранние стадии воспалительных реакций [53]. Нейтрофилы получили своё название благодаря способности окрашиваться смесью кислотных и щелочных красителей, что обусловлено нейтральной средой их гранул [54]. Зрелые нейтрофилы дифференцируются из гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге в процессе, называемом гранулоцитопоэзом или гранулопоэзом. У здоровых людей ежедневно вырабатывается до 10^{11} нейтрофилов, что обеспечивает поддержание их постоянного количества в крови [55]. Количество нейтрофилов в периферической крови у здоровых людей составляет примерно $4.5 \times 10^9/\text{л}$ [56]. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) является основным цитокином, регулирующим гранулоцитопоэз. Отсутствие продукции G-CSF ухудшает гранулоцитопоэз, что приводит к нейтропении [57].

Нейтрофилы составляют первую линию иммунного ответа организма против патогенов. Они обладают высокой активностью и эффективностью в обнаружении и уничтожении бактерий, что объясняет повышенную восприимчивость людей с нейтропенией к бактериальным инфекциям [58].

Структурно нейтрофилы характеризуются многодольчатым ядром, обычно состоящим из 2–5 соединённых долей, что придаёт им высокую гибкость и обеспечивает способность мигрировать через ткани [59]. Зрелые нейтрофилы не способны к делению и имеют короткий срок жизни – от 12 до 24 часов [60]. Однако, новые данные показали что продолжительность жизни нейтрофилов может достигать 5 дней [61]. В очагах воспаления срок жизни нейтрофилов увеличивается за счёт ингибирования апоптоза, вызванного цитокинами, молекулярными паттернами, ассоциированными с патогенами (PAMP), молекулами, связанными с повреждением тканей (DAMP), а также факторами окружающей среды [62]. Гипоксия в тканях во время воспаления активирует гипоксия-индуцируемые факторы, которые запускают пути выживания нейтрофилов и напрямую влияют на их бактерицидную активность. Аналогично, в условиях низкого содержания кислорода и питательных веществ в дыхательных путях при кистозном фиброзе нейтрофилы подвергаются метаболическому перепрограммированию, активируют механизмы выживания и приобретают разнообразные фенотипические и функциональные свойства [62–65].

Одной из характерных особенностей дифференцировки нейтрофилов является координированное включение и выключение генов, кодирующих эффекторные белки, которые транспортируются в мембраносвязанные везикулы – гранулы [66,67]. Цитоплазма нейтрофилов содержит гранулы, наполненные ферментами и антимикробными белками, такими как лизоцим, дефензины и миелопероксидаза (МРО), которые способствуют эффективному уничтожению патогенов (Таблица 1). Гранулы классифицируются в зависимости от состава белков, что точно отражает временные паттерны экспрессии генов в процессе дифференцировки (Таблица 1).

Таблица 1. Ключевые гранулярные белки нейтрофилов человека.

Белок	Другие названия белка (UniProt*)	Функции (UniProt)
Азурофильные (первичные) гранулы нейтрофилов		
Азуоцидин	Катионный антимикробный белок CAP37, HBP	Антибактериальная активность (грамположительные и грамотрицательные бактерии); хемотаксис для моноцитов и фибробластов; гепарин-связывающая активность.
Нейтрофильный дефензин	α -дефензины, пептиды нейтрофилов человека	Антибактериальная, фунгицидная и противовирусная активность.
Миелобластин	Нейтрофильная протеаза 4, лейкоцитарная протеаза 3, AGP7, C-ANCA антиген, P29, антиген Вегенера, протеиназа 3	Сериновая протеаза; облегчает трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов.
Антиген CD63	Гранулофиллин, LAMP-3, OMA81H, антиген меланомы-ассоциированный, тетраспанин-30	Рецептор клеточной поверхности для TIMP1; участвует в активации сигнальных каскадов.
Катепсин G	CG	Сериновая протеаза с трипсин- и химотрипсин-подобной активностью; расщепляет компонент комплемента C3; обладает антибактериальной активностью.
Нейтрофильная эластаза (NE)	Костномозговая сериновая протеаза, эластаза-2, HLE, медуллизин, PMNL-эластаза	Модифицирует функции NK-клеток, моноцитов и гранулоцитов; ингибирует высвобождение нейтрофилов, зависимое от C5a, и хемотаксис.
МРО	–	Бактерицидная активность против широкого спектра организмов
Белок, повышающий проницаемость бактерий (BPI)	Cap57	Цитотоксичность против грамотрицательных бактерий; липополисахарид-связывающая активность.

*UniProt (The Universal Protein Resource): <https://www.uniprot.org>

Аббревиатуры: C-ANCA – цитоплазматические антинейтрофильные цитоплазматические антитела; HBP – белок, связывающий гепарин; HLE – эластаза лейкоцитов человека; PMNL – полиморфноядерные лейкоциты.

Таблица адаптирована из работы Касателлы и соавт. [68].

Таблица 1. Ключевые гранулярные белки нейтрофилов человека. (Продолжение)

Белок	Другие названия белка (UniProt*)	Функции (UniProt)
Специфические (вторичные) гранулы нейтрофилов		
Белок, подобный хитиназе-3	39 кДа синовиальный белок, гликопротеин хряща, CGP-39, GP-39, YKL-40	Лектин, связывающий углеводы, с предпочтением к хитину; играет роль в воспалении.
Липокалин 2	Нейтрофильный ассоциированный липокалин, 25 кДа альфа-2-микроглобулин-связанный субъединица MMP-9, онкоген 24p3, липокалин-2	Транспорт железа; вовлечён в апоптоз, врождённый иммунитет и развитие; ограничивает бактериальную пролиферацию.
Лактоферрин	Лактоферрин, белок, ингибирующий рост, талактоферрин, LF	Связывание и транспорт железа; антимикробная активность; стимулирует сигналы TLR4, хемотаксис и пролиферацию; связывает гепарин.
Гелатиназные (третичные) гранулы нейтрофилов		
Матриксная металлопротеиназа-9 (MMP9)	Гелатиназа B, GELB, 92 кДа гелатиназа, 92 кДа коллагеназа типа IV	Расщепление желатина типов I и V и коллагенов типов IV и V; играет роль в миграции лейкоцитов и резорбции костей.
Фиколин-1	Коллаген/фибриноген-домен-содержащий белок 1, фиколин А, фиколин О, фиколин М	Рецептор, распознающий паттерны, во врождённом иммунитете.
Кателицидин антимикробный пептид (CAMP)	18 кДа катионный антимикробный белок, CAP-18, LL-37	Антибактериальная активность через связывание LPS; расщепляется на два антимикробных пептида FALL-39 и LL-37.
Коллагеназа нейтрофилов	Матриксная металлопротеиназа-8 (MMP8), PMNL-коллагеназа	Расщепляет фибриллярный коллаген типов I, II и III.

*UniProt (The Universal Protein Resource): <https://www.uniprot.org>

Таблица адаптирована из работы Касателлы и соавт. [68].

Многие активные компоненты нейтрофилов могут экспрессироваться и другими типами клеток. Однако их уникальные особенности – субклеточная локализация, количественное преобладание в цитоплазме и специфические механизмы активации – составляют основу всех известных на сегодняшний день эффекторных функций нейтрофилов [66].

По мере созревания нейтрофилы формируют высокомобильные «секреторные» везикулы, содержащие цитохром b₅₅₈ и молекулы адгезии на поверхности мембран. Эти везикулы включают белки плазмы, которые не синтезируются в самих нейтрофилах (альбумин, иммуноглобулины, трансферрин и др.) и имеют эндоцитарное происхождение [69]. Секреторные везикулы меньше и легче гранул других классов и, по-видимому, не содержат протеолитических ферментов. Они несут обширный набор мембрано-ассоциированных белков, включая рецепторы, обычно связанные с плазматической

мембраной. Эти данные позволяют предположить, что секреторные везикулы служат резервуаром плазматической мембраны нейтрофилов и других мембранных белков [70].

Окислительная активность зрелого нейтрофила является высокой и обусловлена интенсивной экспрессией плазматического и гранулярного мультисубъединичного мембраносвязанного фермента – NADPH оксидазы (NOX). Этот фермент активируется посредством сборки комплекса, что приводит к образованию супероксида. Супероксид является высокореактивным соединением, способным модифицировать различные молекулы, включая нуклеиновые кислоты, липиды и белки, и, таким образом, обладает выраженной антимикробной активностью [71].

Нейтрофилы используют как минимум три эффекторных механизма: фагоцитоз, дегрануляцию и образование NET. Эти механизмы включают как окислительные, так и неокислительные пути, которые регулируют эффекторные функции нейтрофилов.

Подобно макрофагам, нейтрофилы способны интернализировать как опсонизированные, так и неопсонизированные частицы. Опсонизация – процесс покрытия патогенов опсонинами (антителами IgG, компонентами комплемента), которые значительно усиливают фагоцитоз, облегчая связывание патогенов с фагоцитами через специфические рецепторы.

Основными опсонинными рецепторами нейтрофилов являются Fc-рецепторы и подгруппа $\beta 2$ -интегринов, которые связываются соответственно с иммуноглобулинами и покрытыми комплементом частицами. В состоянии покоя главными Fc-рецепторами человеческих нейтрофилов выступают Fc γ RIIA (CD32) и Fc γ RIIIb (CD16), тогда как высокоаффинный Fc γ RI (CD64) преимущественно активируется после стимуляции нейтрофилов интерфероном. Фрагмент комплемента C3bi распознаётся активированным $\beta 2$ -интегрином MAC-1 (CD11b/CD18) [72]. Исследования показывают, что, хотя конечным результатом в обоих случаях является интернализация частицы в мембранную вакуоль, механизмы поглощения, опосредованные IgG и комплементом, существенно различаются. Комплемент-опсонизированные частицы интернализуются посредством мягкого «погружения» в клетку, тогда как связывание с Fc γ -рецептором инициирует энергичное расширение псевдоподий, которые окружают и захватывают частицу. После формирования вакуоли она претерпевает серию быстрых ремоделирующих событий, изменяющих её состав и наделяющих способностью уничтожать патогены и утилизировать клеточный дебрис. Этот комплекс процессов называют созреванием вакуоли [72]. Фагосомы представляют собой замкнутую везикулу, в которой нейтрофил концентрирует антимикробную активность, ограничивая при этом повреждение окружающих клеточных структур. Гранулы сливаются с мембраной фагосомы, доставляя

растворимые и мембранные эффекторные белки непосредственно в компартмент, содержащий патоген, или в его непосредственной близости. Комплекс NOX интегрирован в билипидный слой мембраны фагосомы-гранулы и продуцирует внутри фагосомы супероксид, который служит субстратом для гемсвязанного фермента миелопероксидазы. Последняя генерирует токсичные соединения, такие как гипохлорит [66,73].

В целом, дегрануляция нейтрофилов схожа с процессом слияния гранул с фагосомной мембраной, однако происходит на уровне плазматической мембраны [66,74]. В результате растворимые белки гранул высвобождаются во внеклеточное пространство.

В 2004 году Бринкманн и соавторы впервые описали нейтрофилы, выбрасывающие ядерный хроматин и бактерицидные белки в виде нитевидных структур – NET, предназначенных для захвата и уничтожения бактерий [25]. Это стало первым описанием NET как формы иммунного ответа на внешние угрозы. Спустя несколько лет процесс образования NET был включён в понятие нетоза и официально признан как специфический вариант клеточной гибели гранулоцитов, отличающийся от апоптоза и некроза [26]. В последующих исследованиях были детально охарактеризованы структура NET и их молекулярные компоненты. NET формируются из материала распада клеточного ядра и нейтрофильных гранул, включающих NE, MPO, катепсин G, MMP9, белок BPI, лактоферрин и желатиназу, однако коровый компонент состоит из хроматина диаметром 15–17 нм с белковыми доменами диаметром 25 нм. При этом гистоны (H1, H2A, H3 и H4) составляют 70% белков NET. Другие составляющие компоненты включают белки гранул, в том числе протеиназу 3, сериновые протеазы нейтрофилов и кателицидин (пептид LL-37), который косвенно участвует в уничтожении микроорганизмов, захватываемых NET [75]. В настоящий момент известно, что NET играют важную роль в различных патологиях, включая канцерогенез [76]. Основные компоненты NET и их функции показаны в Таблице 2.

Таблица 2. Основные компоненты NET и их функции.

Компонент NET	Источник	Функция в NET
ДНК	Хроматин	Кóровая функция
Гистоны H1, H2, H3, H4	Хроматин	Увеличение проницаемости клеточной стенки бактерий и ее разрушение; защита ДНК от действия нуклеаз
NE	Первичные гранулы нейтрофилов	Разрушение ряда факторов вирулентности энтеробактерий; предотвращение выхода бактерий из фаголизосом

В таблице использованы данные, приведенные в [25,77–79].

Таблица 2. Основные компоненты NET и их функции. (Продолжение)

Компонент NET	Источник	Функция в NET
Сериновые протеазы	Первичные азурофильные гранулы	Проникновение и разрушение бактериальных мембран
Лактоферрин и липокалин 2	Вторичные гранулы	Поглощение ионов железа и ограничение поступления питательных веществ в бактериальные клетки
MPO	Первичные азурофильные гранулы	Образование гипохлорита из анионов хлора
Лизоцим	Первичные и вторичные гранулы	Гидролиз компонентов клеточной стенки бактерий
Дефензины	Вторичные гранулы	Микропорация клеточных стенок бактерий
Желатиназа A MMP2	Третичные гранулы	Разрушение белковых компонентов клеточных стенок; Специфическое разрушение коллагена IV базальных мембран
ROS	Митохондрии	Перфорация клеточных стенок бактерий; активация прочих компонентов NET

В таблице использованы данные, приведенные в [25,77–79].

1.2. Опухоль-ассоциированные нейтрофилы

1.2.1. История изучения

Первые сообщения о противоопухолевом действии нейтрофилов появились в начале семидесятых годов [80]. За 80-90-е годы были накоплены статистические данные о количестве и качестве нейтрофилов в крови и опухолевых тканях онкологических пациентов [81]. В те годы господствовала теория о нейтропении (т.е., о сниженном количестве нейтрофилов) у онкологических пациентов, подкреплённая многочисленными статистическими данными. В 1977 году Хенон с соавторами выявили нарушения функционирования нейтрофилов, а именно неэффективный фагоцитоз, у пациентов с онкологией по сравнению со здоровыми донорами [82]. В том же году другая группа ученых показали наличие дисфункции фагоцитоза в нейтрофилах у больных с онкологией во время ремиссии [83]. В те же года появилось много работ, посвященных активности нейтрофильных ферментов у больных с разными онкологическими заболеваниями [84–86]. Появляются также данные о количестве нейтрофилов у пациентов после терапии онкологического заболевания. Так, было показано, что пациентам с выявленной нейтропенией после химиотерапии требуется снижение дозировки

химиотерапевтического лечения или даже откладывание лечения из-за повышенного риска смертности [87]. Нейтропения встречалась у онкологических больных после использования цитотоксической терапии [88]. К 2000-м годам накопилось много данных о том, что нейтрофилия у пациентов с прогрессирующими онкологическими заболеваниями встречается гораздо чаще, чем нейтропения [89,90]. Как правило, нейтрофилия обычно сопровождалась лимфоцитопенией [91]. Исходя из этого, соотношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR), рассчитываемое как простое соотношение между количеством нейтрофилов и лимфоцитов, измеренных в периферической крови было предложено в качестве потенциального прогностического маркера, отражающего баланс между двумя аспектами иммунной системы: острым и хроническим воспалением (количество нейтрофилов) и адаптивным иммунитетом (количество лимфоцитов) [92]. В 1990 году Блод с соавт. впервые сообщил о разнообразии эффектов нейтрофилов на опухолевые клетки [5]. Согласно их отчету, во многих исследованиях выявлено цитотоксическое действие нейтрофилов на опухолевые клетки, тогда как другие исследователи показали наличие проопухолевых эффектов нейтрофилов [5,6]. Прометастатические эффекты нейтрофилов объяснялись их способностью деградировать субэндотелиальную базальную мембрану, что в конечном итоге приводило к усилению метастазирования, по-видимому, перевешивая любой прямой цитотоксический эффект, который нейтрофилы могли бы оказывать непосредственно на опухолевые клетки [5]. В 1993 году было установлено, что IL-8, иммунный медиатор, ответственный за рекрутирование нейтрофилов, стимулирует ангиогенез [7]. Потенциальная роль нейтрофилов на рост опухоли была описана в 1995 году в исследовании Пекарек с соавт., где было показано, что элиминация гранулоцитов в опухолевых моделях у животных ингибировала рост опухоли [8]. В 2006 году было обнаружено, что нейтрофилы поддерживают ангиогенез на ранних стадиях канцерогенеза [93]. Эти результаты соответствовали полученным Квин с соавт. результатам, показывающим способность опухолевых клеток стимулировать выработку онкостатина М в нейтрофилах, который, в свою очередь, индуцирует выработку сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и увеличивает инвазивные способности опухоли. Тогда же было высказано предположение, что нейтрофилы могут способствовать прогрессированию опухоли и метастазированию [94]. Тем не менее, в других работах была показана способность нейтрофилов уничтожать опухолевые клетки [8] и вырабатывать противоопухолевые цитотоксические медиаторы [95]. Но некоторые потенциально противоопухолевые эффекты нейтрофилов оказались неоднозначными в долгосрочной перспективе. Например, было показано, что процесс выработки ROS нейтрофилами, считавшийся защитным механизмом, ведущим к уничтожению

опухолевых клеток [5], приводил к окислительному повреждению ДНК в эпителиальных клетках легких, таким образом приводя к онкогенной трансформации клеток [96].

В итоге различное действие нейтрофилов на опухолевые клетки и метастазирование были приняты как две стороны одной медали. На начальном этапе развития опухоли — в условиях острого воспаления — нейтрофилы могут участвовать в элиминации клеток опухоли. Однако в условиях хронического воспаления нейтрофилы способствуют развитию рака и метастазированию [80].

Воспаление при онкологических заболеваниях является ключевым фактором, определяющим клинический исход развития заболевания. За последнее десятилетие были изучены различные маркеры воспаления в попытке оптимизировать лечение и предсказать выживаемость пациентов [97–99]. Таким образом, тип воспаления также может быть важным прогностическим маркером при онкологических заболеваниях.

Концепция о том, что опухоли могут возникать в областях хронического воспаления, была открыта Вирховым в 1863 году, который обнаружил лейкоциты в опухолевых тканях и установил впервые связь между воспалением и раком. Хотя гипотеза Вирхова до сих пор остается актуальной, более современная концепция говорит о том, что определенные типы воспалительных клеток помимо создания хронической воспалительной среды, в которой может происходить неопластическая трансформация, играют различные роли в канцерогенезе. Недавние исследования воспаления, связанного с развитием опухоли, сходятся на том, что раковые клетки сами способны регулировать иммунный ответ хозяина, поддерживая воспаление и поляризуя воспалительные клеточные реакции посредством высвобождения биоактивных веществ. Микроокружение опухолей является следствием сложных биологических процессов, который включает сложные перекрестные пути, опосредованные цитокинами и хемокинами [100–102].

1.2.2. Гетерогенность опухоль-ассоциированных нейтрофилов

История гетерогенности нейтрофилов при различных опухолевых заболеваниях началась с исследования Фридлендера и соавт., впервые предложивших функциональную классификацию TAN N1/N2. Авторы предложили новую классификацию нейтрофилов, аналогичную классификации макрофагов M1/M2: N1 – нейтрофилы с провоспалительными свойствами и противоопухолевыми функциями. и N2 – нейтрофилы с противовоспалительными и проопухолевыми функциями [9].

В пионерском исследовании с использованием трех моделей опухолей у мышей: мезотелиомы AB12, гибридомы и Kras – рака легкого, была продемонстрирована способность TGF- β играть роль в поляризации нейтрофилов [9]. Ингибирование TGF- β с

помощью ингибитора малой рецепторной киназы TGF- β типа 1 (ALK5) SM16 увеличивало уровни хемоаттрактантов нейтрофилов в микроокружении опухоли, что приводило к повторному привлечению нейтрофилов. Во всех моделях опухолей профили экспрессии генов TAN из опухолей, обработанных SM16, показали значительное снижение уровня аргиназы и значительное увеличение уровня TNF- α и ICAM-1 по сравнению с TAN от мышей, не получавших SM16 [9]. Сверхэкспрессия аргиназы может привести к истощению L-аргинина в микроокружении опухоли, что нарушает функцию Т-клеток и способствует ускользанию опухоли от иммунного ответа [103]. Повышенные уровни TNF- α и ICAM-1 указывают на провоспалительный статус TAN из опухолей, обработанных SM16. Функциональный анализ выявил повышенную цитотоксичность TAN, выделенных из опухолей, обработанных SM16, против опухолевых клеток, в то время как TAN из нелеченных опухолей оказались нецитотоксичными. В опухолях мезотелиомы AB12 у мышей, получавших SM16, истощение CD8⁺ Т-клеток *in vivo* вследствие инъекции моноклональных антител препятствовало снижению роста опухоли, что указывает на зависимость противоопухолевого действия TAN от CD8⁺ Т-клеток. У мышей, не получавших SM16, истощение TAN *in vivo* наряду с истощением CD8⁺ Т-клеток или без него привело к значительному уменьшению размера опухоли, что указывает на проопухолевую активность TAN [9]. Результаты данного исследования дают базовое понимание морфологических и функциональных различий между фенотипами нейтрофилов N1 и N2, которые в первую очередь регулируются TGF- β . Авторы пришли к выводу, что типичный N2 способствует росту опухоли и что изменение цитокиновой и хемокиновой среды, вызванное терапией SM16, приводит к образованию цитотоксических (N1) нейтрофилов, способных убивать опухолевые клетки [9,101]. В этом исследовании также сообщалось, что противоопухолевые клетки N1, генерируемые в отсутствие TGF- β , продуцировали более высокие уровни TNF- α , CCL3, H₂O₂ и NO и были цитотоксичны для опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [104].

В ряде работ Яблонской с соавт. было показано, что IFN- β способствует поляризацию нейтрофилов в N1 фенотип. В 2010 году были опубликованы данные о способности эндогенного IFN- β ингибировать ангиогенез опухоли посредством репрессии генов, кодирующих проангиогенные (VEGF и MMP9) факторы и хоуминг-рецептор (CXCR4) в инфильтрирующих опухоль нейтрофилах [10]. В последующих исследованиях авторы показали, что IFN- β ингибирует рекрутирование нейтрофилов в опухоль [11] и меняет профиль TAN с N2 в N1 фенотип [12].

В 2016 г. с использованием транскриптомного подхода были описаны различия в профилях экспрессии генов N1 и N2 нейтрофилов [105]. В этом исследовании авторам

удалось установить сигнатуру N1 в сравнении с N2, причем в профиле N1 наблюдалась повышенная экспрессия 136 генов и пониженная экспрессия 2 генов с кратным изменением ≥ 10 [105]. В первую очередь у N2 TAN было продемонстрировано относительное подавление экспрессии генов, связанных с организацией цитоскелета и полимеризацией актина, по сравнению с нейтрофилами костного мозга (KM) и N1 TAN, что увеличивает вероятность того, что после инфильтрации в опухолевую ткань TAN снижают свою активность, связанную с реорганизацией цитоскелета, теряя способность покидать микроокружение опухоли. Также, у N1 TAN наблюдалась повышенная экспрессия многих генов, связанных с презентацией антигенов, особенно связанных с МНС класса I. Многие интегрины и мембранные рецепторы, связанные с секреторными везикулами, экспрессируются на повышенном уровне в N1 TAN по сравнению с N2, что может влиять на реакцию нейтрофилов на иммунные сигналы окружающей среды. Например, IFN γ R1 экспрессируется в нейтрофилах костного мозга и N1, но сильно подавлен в N2, что приводит к потере связи между ними и цитотоксическими Т-клетками, высвобождающими IFN- γ . N1 TAN обладают провоспалительными свойствами и характеризуются более высоким уровнем экспрессии провоспалительных цитокинов IL-12 и TNF- α вместе с различными хемокинами, привлекающими Т-клетки и макрофаги (CXCL10, CCL7, CCL2 и CCL3). CCL17, который привлекает регуляторные Т-клетки, подавлен в N1 TAN по сравнению с N2, что объясняет иммуносупрессивное действие N2 TAN [105].

В 2020 году впервые была проведена поляризация нейтрофилов человека *in vitro*. Для поляризации нейтрофилов в N1-подобный фенотипа был использован коктейль, содержащий LPS, IFN- γ и IFN- β . Для поляризации нейтрофилов в сторону N2-подобного фенотипа был использован коктейль, содержащий L-лактат, аденозин, TGF- β , IL10, простагландин E2 (PGE2) и G-CSF. Полученные *in vitro* поляризованные нейтрофилы соответствовали *in vivo* поляризованным нейтрофилам по маркерам поверхности, цитокиновому профилю и функциональным особенностям, что открывает широкие перспективы для подробного изучения разных фенотипов нейтрофилов *in vitro* [106]. Также в 2020 году было изучено влияние анти-TGF- β (1D11) на рост и метастазирование опухолевых клеток рака кишечника в моделях *in vitro* и *in vivo* [107]. Результаты работы соответствовали результатам, полученным ранее Фридлендером и соавторами [9], и показали, что блокада TGF- β способствует апоптозу опухолевых клеток и подавляет их миграционный потенциал за счет поляризации TAN в сторону N1-фенотипа [107].

В настоящее время известно, что субпопуляции N1 и N2 TAN выполняют разные функции при развитии и распространении опухоли. Нейтрофилы N1 обладают мощной

противоопухолевой активностью в основном за счет высвобождения ими провоспалительных или иммуностимулирующих цитокинов, таких как IL-12, TNF- α , CCL3, CXCL9, CXCL10, что облегчает привлечение и активацию CD8⁺ Т-клеток. Напротив, нейтрофилы N2 обладают сильной иммуносупрессивной и опухоль-стимулирующей активностью, включая стимулирование ангиогенеза опухоли, инвазии и метастазирования с помощью различных факторов, таких как фактор роста гепатоцитов (HGF), онкостатин М, ROS, активные формы азота (RNS), различные MMP и NE [27,108–110].

Важно отметить, что фенотипы нейтрофилов в значительной степени зависят от микроокружения опухоли, и не существует единого, строго определённого фенотипа, характерного для всех нейтрофилов при различных типах опухолей, так же, как и канонической классификации маркеров, однозначно относящих их к тому или иному фенотипу нейтрофилов. Существующая классификация основана на обобщённых наблюдениях функционирования этих медиаторов в различных исследованиях (Таблица 3). В каждой конкретной ситуации, при использовании разных опухолевых моделей, могут наблюдаться вариации, не являющиеся общепринятыми. Например, аргиназа 1 (ARG1) в ряде исследований рассматривается как проопухолевый медиатор благодаря своей способности снижать уровень аргинина и подавлять активность Т-клеток [111–115]. Вместе с тем показано, что ARG1, выделяемая нейтрофилами, может обладать противоопухолевой активностью и индуцировать апоптоз опухолевых клеток [116].

Таблица 3. Общие маркеры (мембранные белки и секретируемые медиаторы) опухоль-ассоциированных нейтрофилов, их функции и общее распределение по противоопухолевому (N1), проопухолевому (N2) и регенеративному фенотипам.

Маркер	Функция	Профиль нейтрофилов	Источники
CD40	Рецептор на поверхности клеток, вовлечённый в активацию и расширение нейтрофилов; способствует цитотоксичности, гранулопозу и элиминации опухоли	N1/маркер активации	[117]
FAS	Рецептор, участвующий в регуляции апоптоза; запускает апоптоз опухолевых клеток путем взаимодействия с лигандом FASL на опухолевых клетках	N1	[118–120]
ICAM-1	Белок, связанный с клеточной мембраной; способствует адгезии и взаимодействию с эндотелиальными клетками; способствует прогрессии воспаления	N1/маркер активации	[105]

Таблица 3. Общие маркеры (мембранные белки и секретируемые медиаторы) опухолеассоциированных нейтрофилов, их функции и общее распределение по противоопухолевому (N1), проопухолевому (N2) и регенеративному фенотипам. (Продолжение)

Маркер	Функция	Профиль нейтрофилов	Источники
TNF- α	Провоспалительный цитокин, стимулирующий иммунную активацию и подавляющий рост опухоли	N1	[105]
IFN γ R1	Рецептор IFN- γ ; опосредует активацию нейтрофилов в сторону провоспалительного и противоопухолевого ответа	N1	[105]
ARG	Фермент; способствует иммуносупрессии за счёт истощения аргинина; подавляет функцию Т-клеток, индуцирует апоптоз опухолевых клеток путем запуска стресса ЭПР	N2/N1	[111,113,114,116]
iNOS	Фермент, расщепляющий аргинин с образованием оксида азота; выполняет двойную функцию: (1) цитотоксичен для опухолевых клеток (противоопухолевый эффект); (2) способствует прогрессии опухоли за счет запуска иммуносупрессии и повреждения ДНК (проопухолевый эффект)	N2/N1	[121–123]
PD-L1	Лиганд программируемой клеточной смерти 1, ингибирует активацию Т-клеток	В основном, N2, но также встречается на N1.	[124–127]
IL10	Противовоспалительный цитокин; способствует иммуносупрессии	N2	[128,129]
CCL17	Хемокин, секретируемый нейтрофилами для привлечения регуляторных Т-клеток (Tregs); способствует иммуносупрессии и прогрессии опухоли	N2	[105,130,131]
S100A8/A9	Белки, активно секретируемые нейтрофилами; функционируют как алармины, активируют сигнальные пути в соседних клетках; способствуют прогрессии опухоли, формируя иммуносупрессивную микросреду	Низкая концентрация — N2, высокая — N1	[132]
MMP9	Матриксная металлопротеиназа; участвует в ремоделировании ткани и инвазии опухоли	N2/ регенеративный фенотип	[10,133]
VEGF-A	Секретируемый белок; стимулирует ангиогенез, что способствует росту опухоли	N2/ регенеративный фенотип	[10,133,134]
VEGFR1	Рецептор, опосредующий активацию нейтрофилов через VEGF-A; способствует их рекрутированию в опухоль и участки гипоксии, что способствует ангиогенезу и росту опухоли	N2/ регенеративный фенотип	[134]

Отдельным пунктом стоит вопрос, в какой момент и по каким причинам нейтрофилы теряют свои противоопухолевые цитотоксические свойства и начинают проявлять свойства, способствующие канцерогенезу. Недавние исследования показали, что опухолевые клетки, пережившие нейтрофил-опосредованную цитотоксичность (через ROS, дегрануляцию и др.), подвергаются NF-κB/STAT3-зависимому перепрограммированию. Это приводит к повышению экспрессии прометастатических факторов (MMP9, S100A8/A9) и молекул, тормозящих привлечение других иммунных клеток (CD47, PD-L1). Такие клетки не только обладают повышенной миграционной и инвазивной активностью, но и избегают иммунного надзора через CD47-CD172a-опосредованное подавление нейтрофилов [135,136].

Помимо классификации N1/N2, в 1983 году было также предложено разделять нейтрофилы, циркулирующие в крови, по их плотности на две категории: нейтрофилы высокой плотности (High-density neutrophils, HDN) и нейтрофилы низкой плотности (Low-density neutrophil, LDN) [137], которые были охарактеризованы как покоящиеся и активированные формы нейтрофилов, соответственно [138]. В 2011 году, Брандао с соавт. выявили наличие высоко представленной фракции LDN в крови онкологических больных [139]. Характеристика LDN показала что, они являются незрелыми и не проявляют цитотоксических свойств в отношении опухолевых клеток по сравнению с HDN [139].

В 2015 году в исследовании Сагив и соавт. было показано, что у мышей по мере прогрессирования опухоли доля LDN резко увеличивалась до такой степени, что LDN становились доминирующей популяцией циркулирующих нейтрофилов [140]. Кроме того, авторы определили TGF-β в качестве необходимого и достаточного фактора, управляющего переходом от HDN к LDN [140]. Анализ функционального ответа нейтрофилов разной плотности на опухолевые клетки показал, что в отличие от HDN, LDN имеют проопухолевую иммуносупрессивную сигнатуру [140]. В 2019 году Сю и соавт. показали наличие фракции незрелых LDN в кровотоке животных с опухолью молочной железы, охарактеризовали их отличную от HDN транскриптомную сигнатуру и подтвердили их способность поддерживать метастазирование опухолевых клеток [141].

LDN были обнаружены в крови пациентов с различными инфекционными и аутоиммунными заболеваниями [142–147]. В том числе, наличие обширных фракций LDN было показано у пациентов с различными онкологическими заболеваниями, а также у пациентов с ремиссией [148], лекарственной устойчивостью [149], и неблагоприятным прогнозом [150,151].

Современные технологии позволяют в большей степени исследовать гетерогенность нейтрофилов. Использование масс-цитометрии (CyTOF) позволило

идентифицировать другие субпопуляции нейтрофилов в популяциях HDN и LDN, связанные с исходом течения онкологического заболевания [151,152]. Высокоточное секвенирование нуклеотидных последовательностей единичных клеток (scRNA-seq) стало удобным инструментом для изучения клеточной гетерогенности нейтрофилов [153–158]. При scRNA-seq нейтрофилов ткани лёгкого у пациентов с раком легких было выявлено пять кластеров нейтрофилов, из них только три кластера присутствовали у мышей с аналогичным заболеванием, и в том числе выделялся один кластер, уникальный для нейтрофилов из непосредственно опухолевой ткани, экспрессирующий набор специфических маркеров (с высоким уровнем Катепсин В и CCL3) [159,160]. Эти результаты соответствуют полученным с помощью CyTOF результатам [152], и указывают на выход гетерогенности нейтрофилов за пределы N1/N2 или HDN/LDN классификаций.

В настоящий момент преобладающей является гибридная концепция о наличии у пациентов с прогрессирующими типами опухолей особого пула нейтрофилов с некими проопухолевыми фенотипами, поддающимися, однако, терапевтической регуляции. И поиск инструментов для этой терапевтической регуляции в сторону противоопухолевого фенотипа является актуальной проблемой прикладной медицинской физиологии и генной инженерии.

1.2.3. Противоопухолевое действие нейтрофилов

Хотя большинство последних исследований сосредоточено на проопухолевых эффектах нейтрофилов, некоторые работы показали их способность проявлять противоопухолевую активность. Механизмы противоопухолевых эффектов во многом остаются неясны, но в настоящий момент предложено несколько путей осуществления прямой и опосредованной цитотоксичности (Рисунок 1).

Нейтрофилы способны уничтожать раковые клетки посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) [161,162]. ADCC была впервые описана Эрной Мёллер в 1965 году [163]. При этом антитела связываются со специфическим антигеном на опухолевой клетке через антигенсвязывающий фрагмент (Fab), а затем — с Fc-рецептором (FcR) на иммунной эффекторной клетке через Fc-фрагмент, выступая в роли моста между опухолевой клеткой и эффекторной клеткой [164]. Такое взаимодействие активирует эффекторную клетку, которая затем уничтожает опухолевую клетку [164]. Известно, что нейтрофилы экспрессируют FcR на своей поверхности и могут выступать в качестве эффекторных клеток для ликвидации опухолей, опосредованной моноклональными антителами [165].

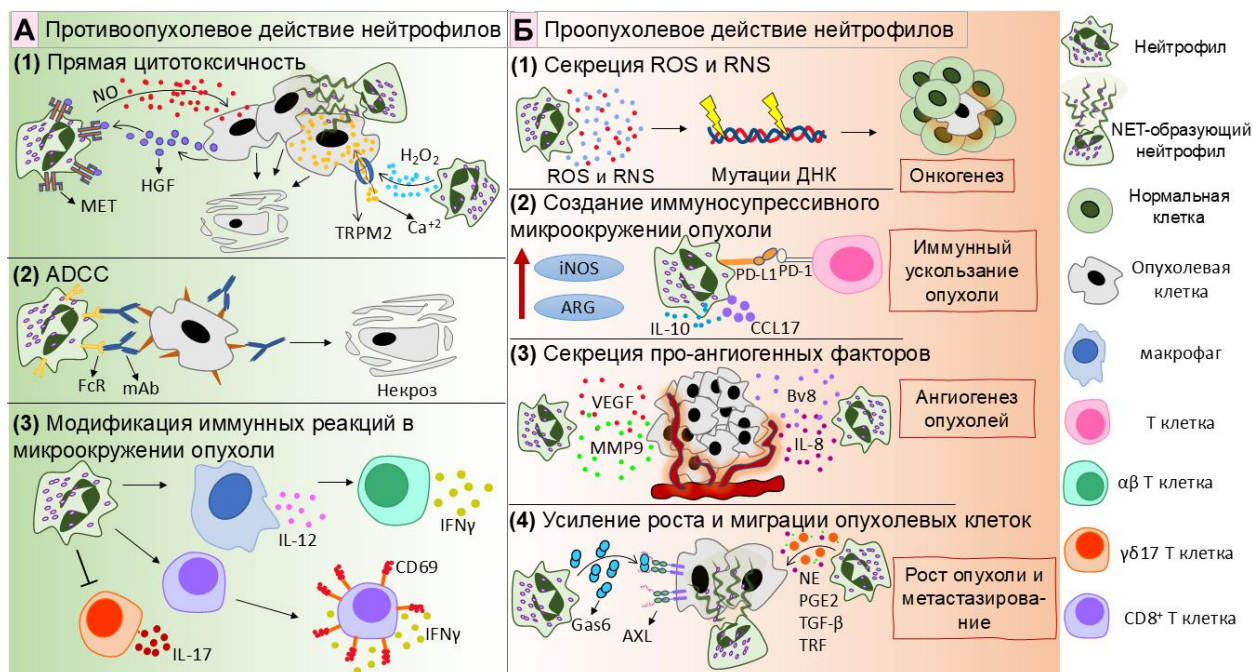


Рисунок 1. Механизмы противоопухолевой и проопухолевой активности нейтрофилов. **(А)** Механизмы противоопухолевой активности нейтрофилов. **(А1)** Нейтрофилы проявляют прямую противоопухолевую активность за счёт продукции ROS и RNS. H_2O_2 , вырабатываемая нейтрофилами, активирует канал TRPM2 и способствует разрушению опухолевых клеток в Ca^{2+} -зависимом механизме [166]. HGF, выделяемый опухолью, взаимодействует с рецептором MET на нейтрофилах и стимулирует продукцию NO, который вызывает разрушение опухолевых клеток [121]. Кроме того, NET могут обладать противоопухолевым эффектом [167,168]. **(А2)** Нейтрофилы убивают опухолевые клетки, покрытые антителами, через ADCC путь, называемый трогоптозом [169]. **(А3)** Нейтрофилы модифицируют иммунные реакции в микроокружении опухоли. Нейтрофилы стимулируют макрофаги к продукции IL-12, что ведёт к поляризации неконвенциональных $CD4^+CD8^-$ $\alpha\beta$ Т-клеток с противоопухолевой активностью, опосредованной IFN- γ [170]. Также нейтрофилы усиливают реактивность $CD8^+$ Т-клеток, выражающуюся в экспрессии CD69 и секреции IFN- γ , и подавляют $\gamma\delta 17$ Т-клетки [171,172]. **(Б)** Механизмы проопухолевой активности нейтрофилов. **(Б1)** Нейтрофилы выделяют ROS и RNS, которые могут вызывать генотоксичность и способствовать онкогенезу [122,173]. **(Б2)** Нейтрофилы участвуют в формировании иммуносупрессивного опухолевого микроокружения, экспрессируя на своей поверхности PD-L1, продуцируя высокие уровни индуцируемой синтазы iNOS и ARG, а также выделяя иммуносупрессивные медиаторы, такие как CCL17 и IL-10 [127–129,131,174]. **(Б3)** Нейтрофилы поддерживают ангиогенез опухоли за счёт секреции нескольких факторов: VEGF, MMP9, IL-8 и Bv8 [10,133,175]. **(Б4)** Нейтрофилы способствуют росту опухоли и метастазированию, продуцируя NE [176], PGE2 [177], TGF- β [178], TRF [179], а также Gas6 [180] и NET [181]. ROS — активные формы кислорода; RNS — активные формы азота; TRPM2 — потенциал-зависимый катионный канал подсемейства М, член 2; HGF — фактор роста гепатоцитов; MET — рецептор тирозин киназы мезенхимально-эпителиального перехода; NET — внеклеточные ловушки нейтрофилов; ADCC — антигензависимая клеточная цитотоксичность; IL — интерлейкин; IFN — интерферон; PD-L1 — лиганд программируемой клеточной смерти 1; iNOS — индуцируемая синтаза оксида азота; ARG — аргиназа; CCL17 — хемокин с мотивом С-С лиганд 17; VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста; MMP9 — матричная металлопротеиназа 9; Bv8 — прокинетицин 2; NE — нейтрофильная эластаза; PGE2 — простагландин E2; TGF- β — трансформирующий фактор роста бета; TRF — трансферрин; Gas6 — рост-зависимый специфический 6.

Одним из возможных механизмов нейтрофильной ADCC является высвобождение нейтрофилами противоопухолевых медиаторов после взаимодействия с опухолевой клеткой, покрытой моноклональными антителами [182]. Недавно был предложен новый механизм нейтрофильной ADCC — трогоптоз [169]. Матлунг и соавторы продемонстрировали, что нейтрофилы могут лизировать опухолевые клетки посредством антителозависимого вторичного трогоцитоза — трогоптоза [169]. Трогоцитоз — это процесс, при котором одна клетка «кусает» и поглощает небольшие фрагменты другой клетки [183]. Этот процесс происходит между живыми клетками и, как полагают, играет роль в клеточной коммуникации [184]. При трогоптозе нейтрофилы интенсивно поедают небольшие фрагменты мембраны опухолевых клеток, что приводит к разрушению мембраны и некротической гибели клеток [169].

Нейтрофилы эффективно взаимодействуют с другими иммунными клетками и регулируют иммунные реакции в опухолевом микроокружении. Понзетта и соавт. показали, что нейтрофилы стимулируют выработку IL-12 макрофагами, что приводит к поляризации нетрадиционных $CD4^+CD8^- \alpha\beta$ Т-клеток, опосредующих IFN- γ -зависимый иммунный ответ против первичного саркомогенеза, вызванного 3-метилхолантеном [170]. Кроме того, было показано, что TAN усиливают противоопухолевый иммунитет, повышая реактивность $CD8^+$ Т-клеток в ответ на стимулы Т-клеточных рецепторов [171]. Также ROS, продуцируемые TAN, вызывают окислительный стресс в IL-17-продуцирующих $\gamma\delta$ Т-клетках ($\gamma\delta17$ Т-клетках) [172]. Ингибирование $\gamma\delta17$ Т-клеток предотвращает развитие проопухолевого иммуносупрессивного микроокружения опухоли, богатого IL-17.

В качестве эффективной цитотоксической стратегии могут выступать АФК, активно генерируемые нейтрофилами спонтанно и в ответ на различные стимулы. H_2O_2 , вырабатываемая нейтрофилами, может опосредовать уничтожение опухолевых клеток [185]. Гершковиц и соавт. показали, что H_2O_2 , продуцируемая нейтрофилами, повышает концентрацию Ca^{2+} в опухолевых клетках до летального уровня [166]. Также было доказано, что вырабатываемый нейтрофилами NO способствует уничтожению опухолевых клеток [121]. Факторы, секретируемые опухолевыми клетками, индуцируют экспрессию мезенхимально-эпителиального переходного тирозинкиназного рецептора (MET) в нейтрофилах. MET взаимодействует со своим лигандом HGF и приводит к NO-опосредованному уничтожению опухолевых клеток [121]. На мышинной модели опухоли показано, что лучевая терапия стимулирует секрецию хемокинов CXCL1, CXCL2 и CCL5, что способствует привлечению нейтрофилов в опухолевый очаг. В ответ нейтрофилы генерируют ROS и подавляют сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы

(PI3K)/протеинкиназы B (AKT)/цинкового пальца белка SNAIL, ингибируя эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) [186].

1.2.4. Проопухолевое действие нейтрофилов

При переключении фенотипа нейтрофилов происходит изменение характера взаимодействия нейтрофилов и опухолевых клеток. При этом опухоль-поддерживающее действие нейтрофилов может проявляться практически на всех этапах опухолевого развития (Рисунок 1).

Нейтрофилы могут способствовать зарождению опухоли, могут вызывать мутации ДНК, способствуя возникновению опухолей эпителия [187]. Впервые это было продемонстрировано в 1999 году Кнапенем и соавт., которые показали, что ROS, продуцируемые нейтрофилами, вызывают мутации ДНК в эпителиальных клетках легких [96]. Нейтрофилы также вызывают повреждение теломерных участков ДНК в гепатоцитах, что дает вклад в развитие гепатоцеллюлярной карциномы [188]. Было показано, что ROS, продуцируемые нейтрофилами, стимулируют онкоассоциированные процессы в клетках лёгкого, подвергшихся воздействию канцерогена [173]. При этом ROS усиливают повреждение ДНК канцерогеном только во время его воздействия на клетки легких [173]. Кроме того, нейтрофилы продуцируют RNS, которые также являются генотоксичными и, как предполагается, способствуют возникновению опухолей [122].

Помимо инициации онкотрансформации нейтрофилы способствуют росту опухоли через различные прямые и косвенные механизмы. В ряде исследований было показано, что продукция PGE2 нейтрофилами усиливает рост опухолевых клеток [177,189,190]. В модели совместного культивирования взаимодействие нейтрофилов и клеток A549 приводило к усилению пролиферации опухолевых клеток, главным образом за счёт продукции PGE2 и NE [177]. Другим механизмом является продукция антагониста рецептора IL-1 в опухолевом микроокружении, который поддерживает злокачественную трансформацию и рост опухоли [191]. Нейтрофилы усиливают пролиферацию клеток почечно-клеточной карциномы посредством индукции экспрессии андрогенных рецепторов в раковых клетках [192]. NE может проникать в опухолевые клетки и разрушать субстрат инсулинового рецептора-1, что приводит к усилению пролиферации через PI3K путь [176].

Нейтрофилы также способствуют метастазированию опухоли с помощью нескольких механизмов. Высокая секреция TGF- β нейтрофилами может объяснять их стимулирующее влияние на миграцию и инвазию раковых клеток [178]. В ответ на GM-CSF, выделяемый опухолью, нейтрофилы секретируют высокие уровни трансферрина —

переносчика железа и мощного митогена, что усиливает рост опухоли и метастазирование [179]. В моделях рака молочной железы Ли и соавт. обнаружили, что нейтрофилы могут снабжать опухолевые клетки липидами в преметастатической нише по пути лизосомального макропиноцитоза [193]. Кроме того, взаимодействие нейтрофилов с ЦОК может повышать эффективность развития метастазов [194].

Нейтрофилы способствуют ангиогенезу опухоли путем секреции различных проангиогенных факторов. Нейтрофилы усиливают ангиогенез посредством продукции VEGF и MMP9 [10]. Галдиеро и соавт. показали, что нейтрофилы секретируют CXCL8/IL-8, VEGF-A и MMP9 в ответ на кондиционированную среду опухолевых клеток [133]. Кроме того, TAN секретируют высокие уровни Vb8 – мощного митогенного фактора для эндотелиальных клеток и ключевого ангиогенного фактора в нейтрофил-зависимом опухолевом ангиогенезе [175,195–197]. Помимо этого, нейтрофилы выделяют HGF [198]. Массена и соавт. доказали наличие VEGFR1 как на человеческих, так и на мышиных нейтрофилах [134]. Уникальная популяция нейтрофилов CD49d⁺VEGFR1^{high}CXCR4^{high} активно инфильтрирует гипоксические области опухоли и по оси VEGF-A/VEGFR1 и способствует ангиогенезу [134]. Помимо ангиогенеза, опухолевые клетки могут использовать уже существующие кровеносные сосуды для поддержания роста – процесс, называемый кооптацией сосудов [199]. Другим не ангиогенным механизмом васкуляризации является сосудистая мимикрия, при которой опухолевые клетки имитируют нормальные сосуды и формируют васкуляризацию на основе раковых клеток [200]. Интересно, что недавние исследования предположили возможную роль нейтрофилов как в кооптации сосудов так и в сосудистой мимикрии [201,202].

Кроме того, нейтрофилы могут создавать иммуносупрессивное опухолевое микроокружение, главным образом за счёт продукции ARG [9,129], IL-10 [129], IL-8 [203], индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS) [129] и CCL17 [174]. Также было показано, что TAN экспрессируют PD-L1 [127,204–206]. PD-L1 взаимодействует с PD-1 (Белок 1 программируемой клеточной смерти) на активированных иммунных клетках, особенно Т-клетках, подавляя их пролиферацию и вызывая иммунную толерантность [207,208].

1.3. Нейтрофильные внеклеточные ловушки

1.3.1. История изучения

Разные морфологические изменения, происходящие при активации нейтрофилов, были описаны еще в 1970 годы. В работе Вайта с соавт. была описана лабилизация специфических гранул полиморядерных лейкоцитов под действием ацетата форбол миристата (РМА), однако азурофильные гранулы оставались интактными [209].

В 1975 году было впервые описано спонтанное высвобождение ДНК из жизнеспособных наивных лимфоцитов [210]. В 1976 году было высказано предположение, что данный процесс имеет отношение к уничтожению патогенов [211,212]. В 1979 году в исследовании Яхертц и соавт. была описана природа высвобожденных молекул ДНК из активированных и наивных лимфоцитов [211]. Результаты показали, что ДНК, высвобожденные из активированных антигеном лимфоцитов, кодируют специфичный для антигена связывающий белок, а молекулы ДНК, высвобожденные из покоящихся лимфоцитов, оказались не кодирующими. Авторы данного исследования предполагали, что описанный процесс высвобождения ДНК из лимфоцитов может быть новым иммуннозависимым механизмом уничтожения антигенов [211].

В 1996 году впервые был описан нетоз как новый вид клеточной гибели [213]. Такеи и соавт. описали необычные морфологические изменения, отличающиеся от апоптоза или некроза, происходящие в РМА-активированных нейтрофилов, такие как деконденсация хроматина (в отличие от апоптоза) и повышенная мембранная проницаемость, возникающие только после резкого нарушения ядерной оболочки (в отличие от некроза) [213].

В 2004 году Бринкманн с соавт. описали нейтрофилы, выбрасывающие хроматин и бактерицидные белки в виде нитеподобных структур, названных нейтрофильными внеклеточными ловушками NET, для захвата бактерий и их уничтожения [25]. Это было первое описание NET как формы ответа на внешнее воздействие. Спустя несколько лет этот процесс был включен в нетоз и был официально принят как вариант специфической клеточной гибели гранулоцитарных клеток, отличный от апоптоза и некроза [26]. В ходе дальнейших исследований были подробно описаны NET и составляющие их компоненты. Нетоз возникает в ответ на различные стимулы, включая активаторы стерильного или инфекционного воспаления. Предполагается, что NET являются первичным иммунным ответом на инфекцию [214]. Нетоз запускается по крайней мере по двум различным путям. Литический нетоз активируется через каскад Raf/MEK/ERK с последующей продукцией ROS через NOX, что приводит к разрыву клеточной мембраны и гибели нейтрофилов. Витальный нетоз запускается через рецепторы TLR2/TLR4 и изменение концентрации Ca^{2+} , что приводит к сохранению способного к фагоцитозу безъядерного цитопласта [215]. Некоторые исследователи выделяют ещё один путь нетоза, витальный нетоз со специфическим задействованием митохондрий, при котором митохондриальные ДНК включаются в состав NET [216]. В 2013 году, Бергер-Ачитув и др. опубликовали первое исследование, показывающее, что TAN вырабатывают NET, указывая на их возможную роль при раке [24].

1.3.2. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в микроокружении опухоли

Нейтрофилы в опухолевом микроокружении активно подвергаются нетозу [217–220]. Гипоксия опухоли может быть одним из факторов, способствующих увеличению продукции NET [221]. Кроме того, опухолевые клетки и клетки микроокружения могут секретировать различные факторы – провоспалительные цитокины, протеазы, экзосомы, которые активируют нейтрофилы и инициируют нетоз (Таблица 4).

Повышенное высвобождение NET наблюдается при многих типах рака: раке молочной железы [222], желудка [223], поджелудочной железы [224], диффузной В-крупноклеточной лимфоме [225], раке легких [226] и тонкого кишечника [221].

Не только опухолевые клетки, но и ассоциированные с раком фибробласты (CAF) могут регулировать нетоз. Показано, что CAF секретируют цитокины CXCL5 [227], CXCL6 [228], IL8 [229], изменяя профиль нейтрофилов и стимулируя нетоз. Кроме того, CAF способны выделять амилоид β , который является возможным триггером нетоза [230].

В свою очередь, NET могут выступать мощным активатором канцерогенеза. Они содержат множество активных компонентов: MPO, NE, продуценты ROS, катепсины, ядерные белки, такие как белок группы высокой подвижности B1 (HMGB1), интерлейкины и другие [40]. Большинство компонентов NET способны активировать опухолевые клетки. Например, NE, ROS и HMGB1 взаимодействуют с рецепторами TLR4 и TLR9, активируя опухолевые клетки через путь p38/NF- κ B [40]. Кроме того, ROS вызывают повреждение ДНК и генетическую нестабильность, способствуя канцерогенезу [231]. Было показано, что NE усиливает рост опухолевых клеток и митохондриальный биогенез посредством взаимодействия с TLR4 на клетках опухоли [232]. В модели аденокарциномы поджелудочной железы, вызванной мутацией *Kras*, NET усиливали рост опухоли косвенно, путем активации звездчатых клеток поджелудочной железы [233].

Некоторые опухолевые клетки могут напрямую активироваться через рецептор CCDC25, узнающий ДНК в составе NET [234]. Через TLR4-зависимые пути NET способствуют дифференциации и росту регуляторных Т-клеток (Treg), создавая иммуносупрессивную среду, благоприятную для развития гепатоцеллюлярной карциномы [235]. При неалкогольном стеатогепатите образование NET обеспечивает формирование провоспалительной среды, способствующей развитию опухоли в печени, что является ключевым событием прогрессирования гепатоцеллюлярной карциномы [236]. Кроме того, NET участвуют в активации спящих раковых клеток. В мышинных моделях два основных компонента NET MMP9 и NE ремоделируют ламинин, который, в свою очередь, активирует спящие раковые клетки [237]. NET-ДНК служит каркасом, связывающим ламинин и координирующим NET-протеазы и раковые клетки рядом [237].

Протеолитические ферменты NET разрушают подавляющий метастазы белок тромбоспондин-1, способствуя метастазированию [238]. Компоненты NET также разрушают внеклеточный матрикс, расширяя опухолевое микроокружение и способствуя формированию преметастатической ниши [36,37].

Таблица 4. Опухолевые факторы, вызывающие нетоз.

Фактор	Источник	Возможные механизмы действия	Ссылка
Амилоид β	CAF	через CD11b по механизму, зависящему от ROS	[230]
Катепсин С	Опухолевые клетки	индуцирует рекрутирование нейтрофилов и продукцию NET через PR3-IL-1 β -NF- κ B	[238]
С3а	результат протеолиза С3 во внеклеточной среде, опухолевые клетки	хемоаттрактант, вызывает рекрутирование LDN к местам метастазов в печени	[239], [240]
CXCL5	CAF и опухолевые клетки	увеличивает хемотаксис нейтрофилов через путь ERK/p38	[241] [242] [227]
CXCL6/ huGCP-2	CAF и опухолевые клетки	хемоаттрактант для нейтрофилов; индукция нетоза через CXCR2	[243] [244] [228]
Экзосомы	CAF и опухолевые клетки	могут изменять фенотип нейтрофилов; запускать нетоза, активация NF- κ B	[245], [246], [247], [248]
G-CSF	CAF и опухолевые клетки	индукция нетоза через NOX	[230][245], [249]
Гипоксия		через путь mTOR и повышение экспрессии HIF-1 α	[221]
IL-8	Опухолевые клетки, эндотелиальные клетки	хемоаттрактант для нейтрофилов; индукция нетоза через CXCR2, активация PI3K/p38/NF- κ B; возможная индукция нетоза через NOX	[250], [251], [229], [252], [253], [254]
IL-17	Th17, CD4 ⁺ , $\gamma\delta$ Т-клетки и опухолевые клетки	механизм неизвестен	[255], [256]

1.4. Нейтрофилы как мишень в терапии рака

Поскольку нейтрофилы могут способствовать развитию опухоли и формированию резистентности к терапии, выбор их в качестве мишени для терапии рассматривается как перспективный подход, дополняющий традиционные методы лечения. В доклинических исследованиях на мышах показано, что истощение нейтрофилов приводит к замедлению роста опухоли [257], снижению метастатического потенциала [258] и усилению эффективности иммунотерапии [259]. Однако, прямое истощение нейтрофилов у человека невозможно из-за их жизненно важной роли в иммунных реакциях и защите организма от инфекций. В связи с этим понимание фенотипической пластичности нейтрофилов при развитии опухоли открывает возможности для их перепрограммирования или смещения баланса в сторону противоопухолевого фенотипа, что является перспективным направлением в разработке новых терапевтических стратегий.

Кроме того, в доклинических и клинических исследованиях рассматривается ряд подходов, направленных на модуляцию активности TAN. К таким стратегиям относятся ингибирование проопухолевого действия нейтрофилов, стимулирование их противоопухолевой активности, блокирование рекрутинга нейтрофилов в микроокружение опухоли, а также разрушение NET. Особое внимание нейтрофилы привлекают в области иммунотерапии рака, где достигнуты значительные успехи, включая разработку CAR-нейтрофилов, несущих химерные антигенные рецепторы, что открывает новые перспективы для эффективного лечения онкологических заболеваний [260–262].

1.4.1. Ингибирование привлечения нейтрофилов в микроокружение опухоли

Привлечение нейтрофилов в микроокружение опухоли обусловлено множеством факторов, продуцируемых как раковыми клетками, так и стромальными клетками [263,264]. Одним из ключевых механизмов является активация CXCR2: агонисты рецептора CXCR2, выделяемые опухолевыми клетками, играют важную роль в рекрутинге нейтрофилов в микроокружение опухоли [229,265–271]. Лиганды CXCR2 также участвуют в индукции преждевременного биологического старения нейтрофилов, что усиливает их проопухолевый потенциал [272]. Опухолевые клетки активно привлекают нейтрофилы в микроокружение опухоли за счёт высокой продукции лигандов CXCR2 [267]. Селективные ингибиторы CXCR2, такие как AZD5069 и SX-682, показывают эффективность в снижении роста опухолей и повышении ответа на иммунотерапию в доклинических и клинических исследованиях, к тому же без побочных эффектов с потерей функциональной активности: нейтрофилы сохраняли способность к фагоцитированию и уничтожению патогенов [273–275]. Однако, противоречивая роль

нейтрофилов в прогрессировании опухоли вызывает сомнения в эффективности данного подхода и делает его оправданным лишь при выраженном наличии проопухолевых TAN [267,276].

1.4.2. Модулирование фенотипа нейтрофилов

TGF- β является ключевым цитокином, участвующим в поляризации нейтрофилов в проопухолевый фенотип N2 [9]. TGF- β сверхэкспрессируется в опухолевых клетках и играет важную роль в прогрессировании опухоли и иммуносупрессии [277,278]. Кроме того, TGF- β , секретируемый опухолевыми клетками, может служить хемоаттрактантом для привлечения нейтрофилов в микроокружение опухоли [267,279,280]. В настоящее время TGF- β рассматривается как перспективная мишень для терапии рака [281]. Де лос Рейес и соавт. разработали математическую модель, оптимизирующую переход нейтрофилов из проопухолевого фенотипа N2 в противоопухолевый N1 с использованием IFN- β и ингибиторов TGF- β , продемонстрировав многообещающие результаты, которые могут быть применены в доклинических исследованиях [282]. В поддержку этих моделей несколько исследований *in vitro* и *in vivo* показали потенциал модуляции функционального состояния нейтрофилов или ингибирования их рекрутинга в микроокружение опухоли с помощью ингибиторов TGF- β [107,279,283,284]. Цинь и коллеги обнаружили, что нейтрализация TGF- β моноклональными антителами в совместной культуре нейтрофилов и клеток аденокарциномы толстой кишки SW480 подавляла миграцию опухолевых клеток и усиливала цитотоксичность нейтрофилов по отношению к опухолевым клеткам. В экспериментах *in vivo* введение антител против TGF- β замедляло рост опухоли у мышей, при этом эффект исчезал при истощении нейтрофилов, что подчёркивает ключевую роль нейтрофилов в этом процессе [107].

Двойной ингибитор рецепторов TGF- β типа 1 и 2 LY2109761 также изучался на мышинных опухолевых моделях, и была продемонстрирована сенсibilизация опухолевых клеток к радиотерапии, а в сочетании с химиотерапевтическим препаратом оксалиплатином происходило подавление роста опухоли и метастазирования за счёт усиления противоопухолевого иммунитета и подавления инфильтрации проопухолевыми TAN [284–286]. Таким образом, LY2109761 представляет собой перспективное средство для комбинированной терапии рака, однако для перехода к клиническим испытаниям необходимы дополнительные исследования.

В литературе описаны различные попытки перепрограммирования нейтрофилов в противоопухолевый фенотип [287–289]. Эти подходы варьировались от использования природных соединений и растительных экстрактов, которые влияли на фенотип

нейтрофилов [287], до инъекций бактериальных частиц (*Staphylococcus aureus*), способных смещать фенотип TAN в сторону противоопухолевого [288], а также добавления в рацион β -глюкана, способствующего мобилизации противоопухолевых нейтрофилов из костного мозга [289].

Более серьёзным и перспективным направлением является иммуностимулирующая терапия, основанная на агонистах CD40, которые способны поляризовать нейтрофилы в эффекторный противоопухолевый фенотип [155]. Несколько агонистических антител к CD40 достигли клинической стадии и продемонстрировали безопасность и хорошую переносимость на ранних этапах испытаний. Однако влияние TAN на эффективность такой терапии ещё требует детального изучения [290].

1.4.3. NET как перспективная терапевтическая мишень

В связи с недавними исследованиями, связывающими NET с возникновением опухоли [235,236], ее прогрессированием [181,232], метастазированием [34,181,291–295] и развитием терапевтической резистентности [296,297], NET были предложены в качестве перспективной терапевтической мишени при онкологических заболеваниях. Одним из основных направлений воздействия на NET является подавление их образования за счёт ингибирования пептидиларгининдеиминазы типа 4 (PAD4) – фермента, необходимого для формирования NET. В этой области было разработано несколько ингибиторов PAD4, среди которых недавно группа Нефедовой представила два новых соединения – BMS-P5 [298] и JBI-589 [299], показавшие многообещающие результаты в доклинических мышинных моделях. Помимо ингибирования PAD4, исследуются подходы, направленные на подавление различных компонентов NET, таких как NE и MPO, а также деградацию NET с помощью ДНКаз.

Цзян и соавт. продемонстрировали, что активация нейтрофилов супернатантами клеток гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) способствует образованию NET [293]. Было показано, что такие активированные нейтрофилы усиливают миграционную активность опухолевых клеток линии HepG2. Однако разрушение NET с помощью ДНКазы I во время их активации подавляло промиграционное воздействие нейтрофилов. В экспериментах мышам с внутрипеченочными опухолями HepG2 внутривенно вводили праймированные нейтрофилы, либо без ингибирования нетоза, либо с применением ДНКазы I или ингибитора PAD4 GSK484. Нейтрофилы без ингибирования нетоза вызывали увеличение числа метастазов в лёгких, тогда как ДНКазой I и GSK484 устраняли этот прометастатический эффект. Более того, у мышей с внутрипеченочными опухолями Hep1-6 внутрибрюшинное введение ДНКазы I и GSK484 показало способность

предотвращать развитие метастазов в лёгких [293]. В моделях колоректального рака введение ДНКазы I или ингибитора NE замедляло рост опухоли и снижало количество метастазов с эффектом, сопоставимым с таковым у мышей с нокаутом PAD4. Такие данные свидетельствуют о том, что подавление образования NET через различные механизмы, включая деградацию ДНК NET с помощью ДНКазы I или ингибирование ферментов, участвующих в формировании NET, эффективно ограничивает прогрессирование опухоли и метастазирование в доклинических моделях колоректального рака [232]. На модели рака молочной железы 4T1, Адровер и соав. продемонстрировали, что разрушение или ингибирование формирования NET посредством различных методов – удаления гена *Pad4*, введение ДНКазы I или дисульфирама – приводило к уменьшению количества метастазов в легкие и значительному снижению области некроза опухоли, что подчеркивает роль NET не только в метастазировании но и в развитии некроза опухоли [300]. В модели гепатоцеллюлярной карциномы на фоне неалкогольного стеатогепатита разрушение NET с помощью введения ДНКазы I или ингибирование нетоза с помощью генетического нокаута PAD4 приводило к снижению роста опухоли в печени. Этот эффект объясняется изменением воспалительной среды и уменьшением уровня и активности Treg в печени, что в свою очередь способствовало снижению опухолевой нагрузки [235,236]. В совместной культуре опухолевых клеток с нейтрофилами при наличии активаторов продукции NET, таких как PMA и IL-8, опухолевые клетки покрывались NET. Опухолевые клетки, покрытые NET, сохраняли жизнеспособность даже при воздействии НК-клеток и цитотоксических Т-клеток [295]. ДНКазы I разрушала NET, восстанавливая прямой контакт между опухолевыми и иммунными клетками, что приводило к эффективной цитотоксичности указанных клеток [295]. Разрушение NET с помощью ДНКазы I может не только воспрепятствовать их проопухолевым эффектам, но и устранить прокоагулянтный потенциал NET, что препятствует образованию тромбов при опухолевых заболеваниях. ДНК и гистоны, входящие в состав NET, способствуют активации коагуляционного каскада и формированию тромбина, а деградация с помощью ДНКазы I снижает тромбообразование и воспаление, улучшая гемостаз и уменьшая риск тромботических осложнений [301–304]. Предлагались также различные системы доставки ДНКазы. Например, Ся и соавт. разработали генотерапевтический подход, направленный на печень, с использованием аденоассоциированного вирусного вектора, экспрессирующего ДНКазу I (AAV-ДНКазы I). В мышинной модели метастатического колоректального рака инъекция AAV-ДНКазы I подавляла метастазирование опухоли в печень за счёт локального разрушения NET [305]. Аналогичные результаты были получены в другом исследовании с использованием мышинной модели метастазирующей

карциномы MMTV-PyMT [306]. Сан и соавт. разработали гибридные наночастицы, состоящие из ДНКазы I и золота (DNase I@Au), предназначенные для аэрозольной ингаляции и селективного удаления NET в легких при развитии опухоли [307]. Этот подход повышал эффективность радиотерапии, уменьшал размер опухоли и снижал количество метастазов в мышечных моделях рака легких [307].

Чен и соавт. разработали фоторегулируемую систему доставки ДНКазы I на основе наночастиц, нагруженных ферментом, которые способны высвобождать ДНКазу I при воздействии лазерного излучения [308]. В модели колоректального рака MC38 (мышинная аденокарцинома толстой кишки) наночастицы, нагруженные ДНКазой I, демонстрировали преимущественное накопление в печени, опухолевых очагах и селезенке. Комбинированная терапия с использованием этих наночастиц в сочетании с лазерным облучением и анти-PD-1 терапией показала синергетический противоопухолевый эффект, проявляющийся в значительном снижении опухолевой нагрузки и улучшении показателей выживаемости. В модели метастатического колоректального рака, индуцированного инъекцией в селезенку клеток MC38 мышам, анализ печени выявил существенное уменьшение задержки опухолевых клеток после лечения наночастицами с ДНКазой I и лазерной терапией. Эти данные указывают на перспективность разработки локальной терапевтической системы, направленной на разрушение внеклеточных нейтрофильных ловушек (NET) в метастатических очагах [308].

Чен и коллеги разработали гидрогель, содержащий ДНКазу I и средство для нейтрализации кислотности опухолевой микросреды, предназначенный для локального применения. В мышинной модели НСС применение этого гидрогеля непосредственно после хирургического удаления опухоли в сочетании с инфузионной терапией НК-клетками способствовало предотвращению рецидива заболевания. Данный подход демонстрирует потенциал использования такой системы доставки в зоне хирургического вмешательства после резекции НСС [309].

Тейджера и соавт. продемонстрировали, что супернатанты нескольких линий опухолевых клеток стимулируют нейтрофилы к образованию NET, и этот эффект устраняется при блокаде рецепторов CXCR1/2. Более того, в животных моделях рака молочной железы и легких агонисты CXCR1/2 преимущественно продуцировались опухолевыми клетками, и их уровень коррелирует с высоким уровнем NET в опухолевой ткани. После применения блокаторов CXCR1/2 наблюдалось значительное снижение уровня NET в опухолях. Эти данные указывают на перспективность использования ингибиторов CXCR1/2 для предотвращения образования NET [295].

Ся и соавт. обнаружили, что NET поддерживают и усиливают злокачественный и метастатический потенциал клеток рака желудка. Эти эффекты устранялись при обработке клеточных культур ингибитором PAD4 (GSK484), ингибитором NE или ДНКазой I. Проопухолевое действие NET осуществлялось через активацию сигнального пути TGF- β в опухолевых клетках. В животных моделях метастатического рака желудка применение ДНКазы I или галунисертиба, ингибитора TGF- β , приводило к подавлению проопухолевых эффектов NET [34].

Несколько исследователей показали, как ингибирование NET может взаимодействовать с уже существующими терапевтическими подходами в доклинических моделях. Было показано, что комбинированное применение ингибиторов NET и терапии анти-PD-1 значительно повышает эффективность последней в различных моделях опухолей у животных [50,255,295,310]. В модели колоректального рака, вызванного клетками MC38, монотерапия анти-PD-1 или ДНКазой I замедляла рост опухоли, а комбинированное применение этих методов приводило к значительному улучшению показателей выживаемости и уменьшению объёма опухоли. Вероятно, этот эффект обусловлен ингибированием способности NET подавлять цитотоксическую активность Т-клеток [50]. В модели рака молочной железы, вызванного клетками 4T1, комбинированное применение ингибитора PAD4 GSK484 и двойная блокада контрольных точек PD-1 и CTLA-4 продемонстрировали синергетическое усиление противоопухолевого эффекта по сравнению с каждой монотерапией по отдельности [295]. В модели рака поджелудочной железы у мышей блокада IL-17, истощение нейтрофилов или нокаут PAD4 усиливали терапевтический эффект анти-PD-1 [255]. Также было показано, что комбинированная терапия анти-PD-1 с эксенатидом улучшает результаты лечения за счёт ингибирования продукции NET [310]. Более того, NET были вовлечены в развитие устойчивости рака мочевого пузыря к лучевой терапии. В мышинной модели инвазивной уротелиальной карциномы, вызванной клетками MB49, лучевая терапия способствовала инфильтрации нейтрофилов и образованию NET в опухолевой ткани. Ингибирование образования NET с помощью нокаута PAD4, применение ингибитора NE или внутримышечное введение ДНКазы I в сочетании с лучевой терапией замедляло рост опухоли и улучшало выживаемость животных [297]. Дальнейшие эксперименты показали, что лучевая терапия стимулирует образование NET через HMGB1, выделяемый опухолевыми клетками, который взаимодействует с рецептором TLR4 на нейтрофилах. Ингибирование HMGB1 или разрушение NET продемонстрировало эффективность в преодолении резистентности к лучевой терапии [297]. Важно отметить, что нейтрофильный HMGB1, интегрированный в NET, участвует в индукции EMT в опухолевых клетках [292]. Таким образом,

подавление HMGB1 прерывает его цикл влияния как на раковые клетки, так и на нейтрофилы.

В целом, ингибирование образования или разрушение NET может ослабить их проопухолевые эффекты и повысить эффективность противоопухолевой терапии. Однако, несмотря на их роль в поддержке опухолевого роста, NET выполняют жизненно важные функции в защите организма от инфекций. Это обстоятельство побуждает исследователей тщательно изучать ингибиторы NET и их влияние на инфекционные процессы, чтобы избежать нежелательных последствий терапии.

1.5. Заключение

Нейтрофилы обладают двойственной ролью в онкологии, проявляя как противоопухолевые, так и проопухолевые свойства. Эта двойственность обусловлена высокой фенотипической пластичностью и гетерогенностью нейтрофилов, которые адаптируются к различным условиям микроокружения опухоли.

Противоопухолевые нейтрофилы способны уничтожать опухолевые клетки, активировать цитотоксические Т-лимфоциты и способствовать формированию воспалительной среды, благоприятной для иммунного контроля опухоли. В то же время, проопухолевые нейтрофилы поддерживают рост и метастазирование опухолей, стимулируя ангиогенез, подавляя иммунный ответ и способствуя формированию NET.

Современные терапевтические стратегии направлены на модуляцию фенотипа нейтрофилов – переключение их с проопухолевого состояния на противоопухолевое. Такой подход усиливает эффективность иммунотерапии и снижает опухолевую прогрессию. Изучение фенотипической гетерогенности нейтрофилов в различных доклинических моделях опухолей, является важным этапом для понимания их функциональных свойств и разработки более точных и безопасных стратегий лечения.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы и препараты

Реактивы для работы с культурами клеток: RPMI 1640, пируват натрия (ThermoFisher Scientific, США), DMEM, OptiMem, HEPES, набор для устранения микоплазмы (Sigma-Aldrich, США), 1%-ный раствор антибиотика-антимикотика, среда для сепарации лимфоцитов LSM (MP Biomedicals, США), фетальная бычья сыворотка (FBS) (BioFroxx, Германия), бычий сывороточный альбумин (BSA) (HyClone, США) и трипановый синий (Macklin, Китай).

Реактивы для работы с нейтрофилами: Ficoll 400 (Sigma-Aldrich, США), EasySep™ Mouse Neutrophil Enrichment Kit (StemCell Technologies, Канада), Dynabeads Sheep anti-Rat IgG (ThermoFisher Scientific, США), антитела Rat анти-Mouse Ly6G (Elabscience, США, Cat# E-AB-F1108A), LPS (Escherichia coli серотипа O55:B5), PMA (Sigma-Aldrich, Германия), ионофор A23187 (Abcam, Великобритания), IFN- γ (Abclonal, Германия), IFN- β (CLOUD-CLONE CORP, Китай) и QVD-Oph (Macklin, Китай).

Флуоресцентные красители и индикаторы: 2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетат (DCFDA) (Sigma-Aldrich, Германия), DIOC6 (ab189808, Abcam, Великобритания), DAPI Fluoromount-G® (SouthernBiotech, США), бромистый этидий (Fluka, Швейцария), набор Annexin V-FITC/PI (Vazyme, Китай).

Антитела для проточной цитометрии были производства Abcam, Elabscience, Sony и BD (США).

Таблица 5. Антитела для проточной цитометрии.

	Маркер	Флуорофор	Производитель и Cat #
Фенотип нейтрофилов	Ly6G	violetFluor 450	Abcam, AB253070
	CD54 (ICAM-1)	FITC	Elabscience, E-AB-F1018C
	CD119 (IFN γ R1)	PE	Elabscience, E-AB-F1115D
	CD95 (FAS)	PE/Cy7	Sony, 1363085
	CD40	PE/Dazzle™ 594	Sony, 1223150
	PD-L1 (CD274)	APC	Elabscience, E-AB-F1132UE
Процент нейтрофилов/ чистота выделения	CD45	FITC	BD, 553080
	CD11b	PerCP-Cy 5.5	BD, 550993
	Ly6G	PE	Elabscience, E-AB-F1108D

Реактивы для выделения РНК, приготовления кДНК и RT-qPCR: RizoL (diaGene, Россия), агароза (Sigma-Aldrich, США), ревертаза M-MuLV-RN, буфер для RT и мастер-микс BioMaster HS-qPCR (Biolabmix, Россия).

Фиксаторы и препараты для гистологии: 10%-ный нейтральный буферный формалин, 4%-ный нейтральный буферный формальдегид, HISTOMIX парафин (BioVitrum, Россия), 37%-ный формальдегид (Sigma-Aldrich, Германия), гематоксилин и эозин (ICN Biomedicals, США), антитела anti-CD163 (ab182422, Abcam, США), набор Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (Abcam, США).

Также были использованы бычья панкреатическая ДНКазы I и IV степени очистки (2400 Kunitz/мг) (Sigma-Aldrich, США), PBS (Servicebio, Китай), МТТ, DMSO, DEPC и TWEEN®20 (Sigma-Aldrich, США), хлороформ, этанол, изопропанол, агароза, борная кислота, глицерин, EDTA, хлорид аммония, гидрокарбонат натрия (Реактив, Россия), физиологический раствор (Красфарма, Россия).

Прочие реактивы были отечественного производства марки “о.с.ч.” и “х.ч.”.

Для культивирования и работы с клетками использовали одноразовый пластик фирмы "Costar" и "TPP" (Sigma, Aldrich, США). Также были использованы 70 мкм сита для клеток (Corning, США), нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм для фильтрации растворов (Gilson, США), инсулиновые шприцы U100 (SFM, Германия) и шприцы 5 и 10 мл (BD, США).

2.1.2. Оборудование

В работе были использованы центрифуги Mini Spin Plus Eppendorf, High-speed Eppendorf 5810R (Eppendorf, Германия) и Contron T42K (Centricon Instruments, Италия), микроскопы AxioStar plus, Axioimager Z, AxioCam MRc5, Primo Vert и конфокальный флуоресцентный микроскоп LSM710 (ZEISS, Германия), многоканальный спектрофотометр Multiscan RC (Thermo LabSystems, Финляндия), планшетный ридер CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany), цитофлуориметр NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США), микротом Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific, США), NanoDrop® oneC (Thermo Fisher Scientific, США), прибор для автоматического подсчета клеток Automated Cell Counter TC20 (Bio-Rad, США), камера Горяева (МиниМед, Россия), гематологический анализатор MicroCC20Vet (High Technology Inc., США), прибор для ПЦР в реальном времени CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, США), ареометр (Стеклоприбор, Украина), магнит (ThermoFisher Scientific, США), pH-метр Orion 410A (Thermo Fisher Scientific, США), миксеры Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, США) и CO₂ инкубаторы (Binder, Германия).

2.1.3. Программное обеспечение

Для обработки полученных результатов использовали следующее специальное программное обеспечение: NovoExpress software v. 1.1.0 (ACEA Biosciences, США), ZEN software 2012 (Zeiss, Германия), ImageJ software 1.54d (Wayne Rasband and contributors, США), GraphPad Prism 8.0.2. (GraphPad Software, США), R 4.4.1, Microsoft Excel 2016, STATISTICA version 10.0.

Для анализа данных использовали интернет-ресурсы NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), RealTime PCR Tool (Integrated DNA Technologies, <https://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>), MFOLD [311] (<http://www.unafold.org/mfold/applications/dna-folding-form.php>). Для изучения стабильности экспрессии выбранных референтных генов использовали BestKeeper [312] в интегрированном в Excel программном обеспечении, загруженном с <https://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html> (версия 1), NormFinder [313], использовался в R, примененном авторами с <https://www.moma.dk/software/normfinder>, geNorm [314], метод ΔC_t [315] и RefFinder [316], использовались по адресу <https://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master/>.

2.1.4. Буферы и растворы

Для приготовления всех буферных растворов и реакционных проб использовали воду, очищенную на установке MilliQ (Millipore, США). Все растворы и среды фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Состав буферов и растворов приведен в Таблице 6.

Таблица 6. Буферы и растворы.

Буфер	Состав
Лизис буфер (ЛБ)	0.15 М NH ₄ Cl, 10 мМ NaHCO ₃ и 0.1 мМ EDTA
RPMI/FBS/EDTA	RPMI 1640, 10% FBS, 1%-ный раствор антибиотика и антимикотика, 2 мМ EDTA
PBS/FBS/EDTA	PBS, 2% FBS, 1 мМ EDTA (PBS/FBS/EDTA)
PBS/MC	PBS, 1% BSA, 15 мМ EDTA
RPMI/NET	RPMI 1640, 1%-ный раствор антибиотика-антимикотика, 5 мМ HEPES, 1 мМ пируват натрия
TBE	2 мМ EDTA, 0.089 М Трис-борат, pH 8.3

2.1.5. Праймеры для PCR

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН и компанией «Синтол» (Москва, Россия). Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе, приведены в Таблице 7.

Таблица 7. Последовательность праймеров для RT-qPCR (уровень мРНК) и qPCR (уровень ДНК, анализ вДНК).

Наименование	Последовательность прямого праймера, 5' → 3'	Последовательность обратного праймера, 5' → 3'	Последовательность зонда, 5' → 3'
<i>Ccl17</i>	CAGACCCCAAGACAA ACATG	GTCACAGGCCGTTT TGTTG	FAM- TGACCTTCCCGCTGAG GCATT-BHQ1
<i>Il10</i>	AACATACTGCTAACCG ACTCC	CAAATGCTCCTTGATT TCTGGG	FAM- ATCATTTCCGATAAGG CTTGGCAACC-BHQ1
<i>Tnfa</i>	TGGAGTCATTGCTCTG TGAAG	CCTGAGCCATAATCCC CTTTC	FAM- TCTGACCCCTTTACTCT GACCCCTT-BHQ1
<i>Icam1</i>	GCAGAGGACCTTAACA GTCTAC	TACTTGGCTCCCTTCCG AGACCT	FAM- TACTTGGCTCCCTTCCG AGACCT-BHQ1
<i>Mmp9</i>	GACATAGACGGCATCC AGTATC	GTGGGAGGTATAGTGG GACA	FAM- TCGGCTGTGGTTCAGT TGTGGT-BHQ1
<i>Vegfa</i>	CCGAAACCATGAACCTT TCTGC	CTTCATGGGACTTCTG CTCTC	FAM- CACTGGACCCTGGCTT TACTGCT-BHQ1
<i>Cd274</i>	CTCATTGTAGTGTCCA CGGTC	ACGATCAGAGGGTTCA ACAC	FAM- ACGCCACATTTCTCCA CATCTAGCA- BHQ1
<i>Vegfr1</i>	AATGGCTTTCACGTTT CCTTG	CCGTAGCAGAATCCAG GTAATG	FAM- CCTCTCCTTCGGCTGG CATCTTT - BHQ1
<i>Hgf</i>	TGTGCCAACAGGTGTA TCAG	CCAGTAGCATCGTTTT CTTGAC	FAM- TGCAAGTGAACGTA GCCCCCTGT- BHQ1
<i>Ern1</i>	GCCCATCAACTTCCCT TCTAT	GACATCTTGTAGTCCA CGTCG	FAM- TGCCACCTATTTTGACT ATGCAGCCT - BHQ1
<i>Fas</i>	CTCAAGGTACTAATAG CATCTCCG	TCCTTGATATAATCCTT CTGAGCAG	FAM- TTATCAGTTTCACGAA CCCGCCTCC - BHQ1
<i>Sirt1</i>	CTCTGAAAGTGAGACC AGTAGC	TGTAGATGAGGCAAAG GTTCC	FAM- TCCAAGTTCTATACCC CATGAAGTGCC - BHQ1
<i>Stat3</i>	GGCACCTTGGATTGAG AGTC	CGAAGGTTGTGCTGAT AGAGG	FAM- AACGTGGCATGTGACT CTTTGCTG - BHQ1

Таблица 7. Последовательность праймеров для RT-qPCR (уровень мРНК) и qPCR (уровень ДНК, анализ вДНК). (Продолжение)

<i>Tbp</i>	AAGAAAGGGAGAATC ATGGACC	GAGTAAGTCCTGTGCC GTAAG	ROX- CCTGAGCATAAGGTGG AAGGCTGTT-BHQ2
<i>Hprt1</i>	CCCCAAAATGGTTAAG GTTGC	AACAAAGTCTGGCCTG TATCC	ROX- CTTGCTGGTGAAAAGG ACCTCTCGAA-BHQ2
<i>Actb</i>	TATTGGCAACGAGCGG TTCC	TGGCATAGAGGTCTTT ACGG	ROX- CCAGCCTTCCTTCTTGG GTATGGAATCC- BHQ2
<i>Gapdh</i>	CAAGGAGTAAGAAAC CCTGGAC	GGATGGAAATTGTGAG GGAGAT	ROX- CCAGCAAGGACACTGA GCAAGAGA- BHQ2
<i>Sdha</i>	CCTACCCGATCACATA CTGTTG	AGTTGTCCTCTTCCATG TTCC	ROX- CAGAGCAGCATTGATA CCTCCCTGT- BHQ2
<i>Ywhaz</i>	GAAGACGGAAGGTGCT GAG	GACTTTGCTTTCTGGTT GCG	ROX- AGAGAGAAGATCGAG ACGGAGCTGC- BHQ2
<i>B2m</i>	GGTCGCTTCAGTCGTC AG	TTCAGTATGTTCCGGCTT CCC	ROX- CCCTGGTCTTTCTGGTG CTTGTCT- BHQ2
<i>Eef2</i>	ACATTCTCACCGACAT CACC	GAACATCAAACCGCAC ACC	ROX- GAACATCAAACCGCAC ACC- BHQ2
<i>Rpl13a</i>	CAAGACCAACGGACTC CTG	TCTCTAATGTCCCCTCT ACCC	ROX- AAGACTGTTTGCCTCA TGCCTGC- BHQ2
<i>Rack1</i>	AATACTCTGGGTGTCT GCAAG	TTAGCCAGATTCCACA CCTTG	ROX- ATGGGTGTCTTGTGTC CGCTTCTC- BHQ2
<i>Actb*</i>	GAGGTATCCTGACCCT GAAGTA	TCTACAATGAGCTGCG TGTG	
<i>Nd3*</i>	AATGCGGATTCGACCC TAC	CTTCTACTTCCACTACC ATGAGC	

* Праймеры для анализа вДНК

2.1.6. Культуры клеток

C57Bl/6-производная меланома B16-F10 была приобретена в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Модифицированные клетки RLS₄₀ были получены из коллекции ИХБФМ СО РАН.

Клетки B16 и RLS₄₀ инкубировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 1%-ный раствор антибиотика-антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 10 мг/мл стрептомицина, и 25 мкг/мл амфотерицина), в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C (стандартные условия, с.у.), и регулярно пассировали для поддержания экспоненциального роста.

2.1.7. Лабораторные животные и модели опухолей

В работе использовали 10 – 14-недельных мышей линии CBA/LacSto (далее CBA) и C57Bl/6 (далее C57Bl) развода вивария ИЦиГ СО РАН и ИХБФМ СО РАН. Животных содержали по 10 особей в клетке в хорошо освещенном помещении. Мыши имели свободный доступ к еде и воде. Эксперименты с животными проводили согласно директиве ЕСС Directive 2010/63/EU. Протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по этике экспериментов на животных при Институте цитологии и генетики СО РАН (этическое одобрение № 49 от 23 мая 2019 г.).

Для работы использовали опухолевые модели меланомы мыши B16, лимфосаркомы RLS₄₀ [317] и карциномы легких Льюис (LLC). Штамм LLC был любезно предоставлен к.б.н. Поповой Н.А. (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Опухоль LLC поддерживались пассированием на мышах C57Bl в виварии ИХБФМ СО РАН.

2.2. Методы

2.2.1. Электрофорез в агарозном геле

Качество выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле в буфере TBE при напряжении электрического поля 20 В/см. Гель окрашивали бромистым этидием, фотографировали при визуализации в ультрафиолетовом свете с использованием прибора Infinity-1500/36M.

2.2.2. Получение первичных культур клеток

2.2.2.1. Получение суспензии клеток костного мозга (КМ)

У животных после эвтаназии забирали большие и малые берцовые кости после тщательного удаления мышечных тканей. Кости стерилизовали 70%-ным этанолом, промывали PBS, надрезали эпифизы и костный мозг вымывали с помощью инсулинового шприца U-100 раствором RPMI/FBS/EDTA. Костный мозг ресуспендировали и центрифугировали при 1400 об/мин (327 g) в течение 7 мин, супернатант удаляли, к осадку добавляли 1.5 мл лизирующего буфера (ЛБ) и инкубировали в течение 7 мин. Затем доводили объем до 15 мл добавлением PBS для нейтрализации ЛБ и клеточную суспензию центрифугировали при 1400 об/мин в течение 7 мин. Клетки дважды промывали раствором RPMI/FBS/EDTA и ресуспендировали в соответствующем буфере в зависимости от протокола.

2.2.2.2. Получение суспензии спленоцитов

У животных после эвтаназии забирали селезенки, помещали в стерильную чашку Петри, содержащую 1 мл RPMI/FBS/EDTA и гомогенизировали. Суспензию спленоцитов фильтровали через клеточное сито 70 мкм, осаждали центрифугированием и лизировали эритроциты как описано в п. 2.2.2.1.

2.2.2.3. Выделение нейтрофилов на градиенте фиколла различной плотности

Растворы фиколла плотностью 1.077, 1.083, 1.090, 1.110 и 1.119 г/мл готовили путем растворения порошка фиколла 400 в PBS при комнатной температуре. Плотность растворов измеряли с помощью ареометра.

Методу центрифугирования на двуслойном градиенте: Клетки КМ или спленоциты, полученные как описано в п. 2.2.2.1. и 2.2.2.2, ресуспендировали в PBS, наносили на двухслойный градиент фиколла (1.077/1.119 г/мл), и центрифугировали при 666 g в течение 30 мин при 25°C. Нейтрофилы собирали на границе между фиколлом 1.077 и фиколлом 1.119, дважды промывали раствором RPMI/FBS/EDTA и ресуспендировали в PBS с 2%-ным FBS.

Метод центрифугирования на трехслойном градиенте: Клетки КМ или спленоциты, полученные как описано в п. 2.2.2.1. и п. 2.2.2.2., ресуспендировали в PBS, содержащем 1%-ный BSA, наносили на трехслойный градиент фиколла (1.083/1.090/1.110 г/мл) и центрифугировали при 1500 g течение 30 мин при 25°C. Клетки из верхней фазы (градиент 1.083) удаляли, нейтрофилы из интерфазы между градиентами 1.090/1.110 и верхней части слоя градиента 1.110 собирали. Нейтрофилы дважды промывали PBS, содержащим 1% BSA и 15 mM EDTA, и ресуспендировали в PBS с 2% FBS.

2.2.2.4. Выделение нейтрофилов с помощью отрицательной магнитной селекции

Количество костно-мозговых клеток и спленоцитов, полученных как описано в п. 2.2.2.1. и п. 2.2.2.2., измеряли с помощью счетчика клеток, затем клетки ресуспендировали в PBS в концентрации 1×10^8 кл./мл. Нейтрофилы выделяли с помощью набора EasySepTM Mouse Neutrophil Enrichment Kit по модифицированному протоколу. К суспензии добавляли сыворотку крови крысы (50 мкл/мл образца) и обогащающий коктейль (50 мкл/мл образца), и инкубировали в течение 15 мин при 4 °C. Далее клетки промывали в растворе PBS/МС и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в PBS/FBS/EDTA в концентрации 1×10^8 кл./мл, добавляли коктейль с биотином для отбора (50 мкл/мл образца), и инкубировали в течение 15 мин при 4°C. Магнитные частицы добавляли к образцу (150 мкл/мл образца), и инкубировали при 4°C в течение 10 мин. Далее объем образца

доводили до 2.5 мл с помощью PBS/МС, перемешивали и помещали в магнит на 3 мин. Не извлекая образец из магнита, проводили отбор супернатанта, содержащего нейтрофилы, в новую пробирку для дальнейшего использования.

2.2.2.5. Выделение нейтрофилов с помощью положительной магнитной селекции

Суспензии КМ или спленоцитов из п. 2.2.2.1. и п. 2.2.2.2. ресуспендировали в 500 мкл PBS/МС, добавляли 2 и 1 мкг антитела Rat анти-Ly6G, соответственно, и инкубировали при 4°C в течение 20 мин. Клетки промывали и ресуспендировали в 1 мл PBS/МС, после чего добавляли 20 и 10 мкл Dynabeads Sheep anti-Rat IgG, конъюгированных с магнитными микрочастицами, соответственно, и инкубировали при 4°C в течение 20 мин. После инкубации объём образца доводили до 1 мл и помещали в магнит на 2 мин. Супернатант удаляли, клетки с Dynabeads промывали 4 раза с помощью PBS/МС в магните.

2.2.2.6. Активация нетоза

Стерилизованные покровные стекла помещали в лунки 24-луночного культурального планшета и обрабатывали раствором поли-L-лизина при комнатной температуре в течение 20 мин. Далее раствор поли-L-лизина удаляли, покровные стекла промывали PBS. Выделенные нейтрофилы дважды промывали RPMI/NET. Клетки ресуспендировали в RPMI/NET (100 тыс.кл в 500 мкл). К клеточной суспензии добавляли 50 – 500 нМ PMA, 100 мкг/мл LPS или 5 мкМ ионофора A23187. Клетки помещали на покровные стекла и инкубировали при стандартных условиях в течении 3 ч.

2.2.2.7. Приготовление первичной культуры опухолевых клеток LLC

Для формирования солидной опухоли клетки LLC (10^6 кл., в 0.1 мл PBS) вводили в/м в правую бедренную мышцу мышей линии C57Bl (самцам). На 14 – 16 дни развития опухоли животных подвергали эвтаназии, отделяли пласт опухолевой ткани и помещали в 5 мл PBS во льду. Опухолевую ткань гомогенизировали и фильтровали через клеточное сито 70 мкм до состояния однородной суспензии.

Суспензию клеток наносили на 5 мл среды LSM и центрифугировали при 450 g в течение 15 мин. Клеточную фракцию собирали, промывали PBS и центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, клеточный осадок суспендировали в PBS и повторяли процедуру центрифугирования на LSM, после чего клетки LLC суспендировали в PBS. Количество клеток подсчитывали с помощью счетчика клеток при окрашивании трипановым синим.

2.2.3. Оценка жизнеспособности клеток

Жизнеспособность и количество клеток оценивали с помощью трипанового синего согласно рекомендациям производителя с помощью автоматического счетчика клеток TC20 (Bio-Rad, Hercules, CA, США). Также для клеток, выделенных с использованием протокола положительной МС (магнитная сепарация), выход и жизнеспособность измеряли с помощью трипанового синего в камере Горяева с использованием микроскопа Axiostar plus путём подсчета количества клеток в 10 независимых полях.

2.2.4. Проточная цитометрия

2.2.4.1. Оценка чистоты выделения нейтрофилов

Клеточные суспензии, полученные как описано в п. 2.2.2.3, п. 2.2.2.4 и п. 2.2.2.5, инкубировали с антителами анти-CD11b-PerCP/Cy5.5, анти-Ly6G-PE и анализировали с помощью проточной цитометрии на приборе NovoCyte 3000. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения NovoExpress. Синглеты отбирали из точечного графика FSC-H против FSC-A после исключения дребриса, затем нейтрофилы определяли двойные положительные события CD11b⁺ и Ly6G⁺.

2.2.4.2. Оценка процента нейтрофилов в селезенке

Суспензию спленоцитов (5×10^5 кл.), полученную как описано в п. 2.2.2.2, центрифугировали при 300 g в течение 10 мин, ресуспендировали в PBS с 10% FBS, а затем инкубировали с антителами к CD45 (FITC), CD11b (PerCP-Cy 5.5) и Ly6G (PE) согласно рекомендациям производителя. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на приборе NovoCyte 3000. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения NovoExpress. Процент нейтрофилов (CD11b⁺ Ly6G⁺ события) был рассчитан относительно CD45⁺ событий.

2.2.4.3. Оценка экспрессии маркеров нейтрофилов

Для каждой панели проточной цитометрии использовали от 2×10^5 до 5×10^5 нейтрофилов. Клетки осаждали центрифугированием при 300 g в течение 10 мин и ресуспендировали в PBS с 10% сывороткой крысы для нейтрофилов, выделенных методом положительной МС, или с 10% FBS для нейтрофилов, выделенных методом отрицательной МС. После инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, окрашивали антителами к Ly6G, CD54 (ICAM-1), CD119 (IFN γ R1), CD95 (FAS), CD40 и PD-L1 (CD274) (Таблица 5, Рис. S1) согласно рекомендациям производителя и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 20 мин. После окрашивания клетки дважды промывали PBS и анализировали с помощью проточной

цитометрии на приборе NovoCyte 3000. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения NovoExpress.

2.2.4.4. Оценка уровня апоптоза

Нейтрофилы ($2 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ кл.) окрашивали аннексином V-FITC и пропидиум йодидом PI в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы анализировали с помощью проточной цитометрии на приборе NovoCyte 3000. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения NovoExpress.

2.2.5. Визуализация NET с помощью конфокальной микроскопии

После активации нетоза, как описано в п. 2.2.2.6, в лунки добавляли 100 мкл 24% формальдегида и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин для фиксации образцов. После фиксации среду удаляли, промывали PBS и добавляли 0.1% TritonX100, и образцы инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре для пермеабилзации клеток. После пермеабилзации была выполнена блокировка для снижения неспецифического окрашивания путем инкубации в блокирующем буфере (1% FBS, 1% BSA в PBS) в течение 30 мин с последующей блокировкой крысиными антимышиными антителами к CD16/32 (1:200) в течение 30 мин.

Для окрашивания образцы инкубировали с кроличьими антимышиными антителами к MPO (1:50) в течение 1 ч при 37 °C. Покровные стекла дважды промывали PBS и окрашивали вторичными козьими анти-кроличьими антителами к H&L IgG с красителем Alexa Fluor® 680 (1:500) в течение 1 ч при 37°C. После этого покровные стекла дважды промывали PBS и обрабатывали раствором липофильного красителя DIOC6 (0.6 мкг/мл) и инкубировали при 37°C в темноте в течение 20 мин. После завершения инкубации супернатант убирали, покровные стекла промывали PBS, извлекали из лунки и помещали в 10 мкл DAPI Fluoromount-G ® (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) на предметном стекле. Предметные стекла инкубировали в темноте при комнатной температуре в горизонтальном положении в течение суток, а затем анализировали с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии. Полученные изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения ZEN 2012 и программного обеспечения ImageJ версии 1.54d. NET были идентифицированы как протяженные нити ДНК, высвобождаемые нейтрофилами, или деконденсированная облаковидная внеклеточная ДНК. Для количественной оценки NET были посчитаны клетки в 10 неперекрывающихся полях. Результаты представляли, как процент нейтрофилов, образующих NET.

2.2.6. Оценки продукции ROS в нейтрофилах

Для оценки продукции ROS в нейтрофилах использовали 2',7'-дихлорфлуоресцин диацетат (DCFDA). Нейтрофилы инкубировали с 10 мкМ DCFDA при 37°C в течение 30 мин. Далее клетки промывали PBS, обрабатывали 5 мкМ A23187 и переносили в 96-луночный планшет (10⁴ кл./лунку). Флуоресценцию измеряли при длинах волн 483 нм/530 нм. Флуоресценцию измеряли через 10 мин – 90 мин с использованием планшетного сканера CLARIOstar Plus. Нестимулированные нейтрофилы использовали в качестве контроля.

2.2.7. Выделение РНК и приготовление кДНК

РНК выделяли из нейтрофилов костного мозга и селезенки с использованием Rizo1 (Диаэм, Россия) согласно инструкции производителя. Чистоту и целостность выделенной РНК анализировали с помощью NanoDrop ® и методом гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Образцы кДНК получали с использованием обратной транскриптазы M-MuLV–RN. Реакционную смесь объемом 40 мкл, содержащую 2 мкг суммарной РНК, 200 ед. обратной транскриптазы в буфере ОТ, 1 мкМ праймеров dT18 и 1 мкМ гексамера, инкубировали при 42°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали нагреванием при 70°C в течение 10 мин. Образцы кДНК разводили в 10 раз и хранили при -80 °C.

2.2.8. RT-qPCR

2.2.8.1. Подбор праймеров

Для выбора праймеров и зондов использовался инструмент RealTime PCR Tool (Таблица 7). Потенциалы само- и гетеродимеризации праймеров и зондов были проанализированы с помощью инструмента OligoAnalyzer™. Ампликоны были проанализированы на предмет образования вторичных структур с помощью MFOLD.

2.2.8.2. Реакционная смесь и условия

Реакционная смесь объемом 12.5 мкл содержала 12.5 нг кДНК, BioMaster HS-qPCR, по 0.4 мкМ каждого из прямых и обратных специфических праймеров и по 0.25 мкМ зондов. Условия реакции были следующие: (1) 95°C, 6 мин; (2) 95°C, 15 сек; 56°C, 20 сек; 70°C, 60 сек, 45 циклов.

Эффективность амплификации праймеров оценивали с использованием 1, 10, 100 и 1000-кратных разведений объединенных кДНК трех технических реплик для каждого гена. Относительное кратное изменение генов анализировалось с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$

[318], с использованием *Tbp* и *Hprt1* в качестве референсных генов. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ рассчитывали в Microsoft Excel 365.

2.2.8.3. Выбор референсных генов с помощью биоинформатического анализа

Была протестирована стабильность экспрессии генов *Tbp*, *Hprt1*, *Ywhaz*, *B2m*, *Gapdh*, *Actb*, *Sdha*, *Eef2*, *Rack1* и *Rpl13a* методом RT-qPCR. Для анализа использовали кДНК, приготовленную как описано в п.2.2.7. PCR проводили, как описано в п. 2.2.8.2. Для изучения стабильности экспрессии выбранных референсных генов использовали BestKeeper [312], NormFinder [313], geNorm [314] и метод ΔC_t [315]. Общий рейтинг формировали с помощью RefFinder [316]. BestKeeper использовали в интегрированном в Excel программном обеспечении, NormFinder использовали в программном обеспечении R. Анализ geNorm и методом ΔC_t проводили с помощью инструмента RefFinder.

2.2.9. Опухолевые модели

2.2.9.1. Имплантация опухолей

Карцинома легких Льюис (LLC) с первичным опухолевым узлом. Клетки LLC (10^6 кл. в 0.1 мл PBS) имплантировали в/м в правую бедренную мышцу мышам линии C57Bl (самцам) для формирования опухолевого узла. Мышей выводили из эксперимента на 15-ый день развития опухолей.

Лимфосаркома RLS₄₀. Клетки RLS₄₀ (10^6 кл./мл в 0.1 мл PBS) имплантировали в/м в правую бедренную мышцу мышам линии CBA (самцам) для формирования опухолевого узла. Мышей выводили из эксперимента на 21-ый день развития опухолей.

Меланома B16. Клетки B16 (10^5 кл. в 0.1 мл OptiMem) имплантировали подкожно (п/к) в холку мышам линии C57Bl (самцам). Мышей выводили из эксперимента на 21-ый день развития опухолей.

2.2.9.2. Определение параметров опухолевого роста

В ходе эксперимента, как только опухоли начинали пальпироваться, каждые 2–3 дня отслеживали динамику роста штангенциркулем в трех взаимно перпендикулярных направлениях. Объем опухоли подсчитывали по формуле: (длина×высота×ширина) × $\pi/6$.

2.2.9.3. Сбор биологического материала

На 15-ый день (для модели LLC) или 21-ый (для моделей RLS₄₀ и B16) развития опухолей у мышей собирали кровь из ретроорбитального синуса и животных подвергали эвтаназии. Селезенку забирали и помещали в PBS для выделения нейтрофилов. Далее проводили забор материала для последующего патоморфологического и морфометрического исследований: тимус, а также печень в случае RLS₄₀. Исследуемые

органы и опухолевые узлы фиксировали в 10%-ном нейтральном растворе формалина в течение семи дней.

2.2.9.4. Гистологическое исследование и морфометрирование

Для гистологического исследования образцы опухоли, печени и тимуса фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, осветляли ксилолом и заливали в парафин HISTOMIX. Парафиновые срезы (толщиной до 5 мкм) готовили на микротоме и окрашивали гематоксилином и эозином.

Для иммуногистохимического исследования срезы тимуса депарафинировали и регидратировали. Демаскировку антигенов проводили после обработки в микроволновой печи мощностью 700 Вт. Образцы инкубировали с первичными антителами к CD163 согласно протоколу производителя. Затем срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HPR) и 3,30-диаминобензидином (DAB), и окрашивали гематоксилином Майера.

Морфометрический анализ срезов печени включал оценку относительной площади метастазов печени, указывающей процентное соотношение площади внутренних метастазов в печени по отношению к общей площади срезов печени, с использованием Adobe Photoshop. Торможение развития метастазов оценивали путем вычисления индекса ингибирования метастазов (МИ):

$$\text{МИ} = \left(\frac{\text{средняя площадь метастазов}_{\text{контроль}} - \text{средняя площадь метастазов}_{\text{эксперимент}}}{\text{средняя площадь метастазов}_{\text{контроль}}} \right) \times 100\%.$$

МИ у мышей с опухолью без лечения (контроль) принимался за 0%, а МИ, отражающий отсутствие метастазов, – за 100%.

Морфометрический анализ срезов опухоли и тимуса проводился методом точечного подсчета с использованием морфометрической сетки со 100 узловыми точками на площади 3.2×10^6 мкм². Морфометрический анализ опухолевой ткани включал оценку численной плотности (Nv) макрофагов на единицу площади. Морфометрический анализ срезов тимуса включал оценку объемной плотности (Vv, %) коркового и мозгового вещества с последующим расчетом соотношения коркового и мозгового вещества (корково-мозговой индекс), а также численной плотности (Nv) CD163⁺ макрофагов.

Объемная плотность (Vv, %) исследуемой гистологической структуры указывает на то, что объемная доля ткани, занимаемая этим компартментом, определяется по контрольным точкам, лежащим над этой структурой, и рассчитывается по следующей

формуле: $V_v = (P_{\text{structure}}/P_{\text{test}}) \times 100\%$, где $P_{\text{structure}}$ обозначает количество точек над структурой, а P_{test} – общее количество контрольных точек, в данном случае 100. Численная плотность (N_v) исследуемой гистологической структуры показывает количество частиц в единице объема ткани и оценивается как количество частиц в единице площади, в данном случае 3.2×10^6 мкм². Из каждого образца печени, опухоли или тимуса было исследовано от десяти до пятнадцати случайных полей зрения.

Все гистологические изображения были изучены и отсканированы с помощью микроскопа Axiostar Plus при увеличении $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$.

2.2.9.5. Анализ крови

Кровь животных-опухоленосителей собирали, как описано в п. 2.2.9.3. Кровь здоровых животных собирали в 4 приема с интервалом в 7 дней. Гематологические параметры, такие как общее и дифференциальное количество лейкоцитов, оценивали с помощью гематологического анализатора.

Кровь также анализировали на стеклах в виде мазков. Для этого мазки крови высушивали, фиксировали в течение 30 мин в 96%-ном этаноле и окрашивали с помощью красителя Романовского-Гимзы в PBS. Относительное количество лейкоцитов в мазках оценивали с помощью микроскопа и считали относительно общего количества в каждом образце.

2.2.9.6. Приготовление сыворотки крови

Сыворотку крови получали методом формирования сгустка крови путем инкубации при 37°C в течение 30 мин с последующей инкубацией при 4°C в течение ночи. Сгусток извлекали и сыворотку центрифугировали при 1000 g и 4°C в течение 20 мин. Образцы хранили при –70 C.

2.2.9.7. Выделение вДНК из сыворотки крови

вДНК была выделена с использованием набора для экстракции геномной ДНК из клеток, тканей и крови (Biolabmix, Новосибирск, Россия) согласно рекомендациям производителя. Концентрация вДНК количественно определялась с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) с использованием набора Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями производителя. Качество вДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop™ ND-1000 (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

2.2.9.8. Определение количества ядерной и митохондриальной ДНК в образцах вДНК методом qPCR

Реакционная смесь (20 μ L) содержала 0.1 нг вДНК, Bio Master CorHS-qPCR с SYBR-Green (BiolabMix, Новосибирск, Россия) и 0.6 μ M каждого из праймеров — прямого и обратного, специфичных для ядерного гена (*Actb*) и митохондриального гена (*Nd3*). Последовательности праймеров приведены в Таблице 7. ПЦР проводили на системе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., Геркулис, Калифорния, США). Условия реакции были следующими: 95 °C — 6 мин; 95 °C — 15 с; 60 °C — 20 с; 70 °C — 60 с; 40 циклов. Соотношение митохондриальной и ядерной ДНК рассчитывали, как отношение копий митохондриального гена *Nd3* к ядерному гену *Actb*.

2.2.10. Исследование изменения фенотипа нейтрофилов под действием ДНКазы I на различных моделях опухолей

Имплантацию клеток B16 самцам линии C57Bl и клеток RLS₄₀ самцам линии СВА проводили, как описано в п. 2.2.9.1. Начиная с четвертого дня после имплантации опухоли животных каждой опухолевой модели делили на 2 группы, и животные получали в/м: группа 1 (контроль) – физ./раствор (0.1 мл); 2 – ДНКазу I в дозе 100 ед.акт /мышь (0.1 мл в физ./растворе). Введение проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). Для мониторинга тяжести заболевания проводили взвешивание мышей два раза в неделю. На 21 день развития опухолей B16 и RLS₄₀ через 1 час после последней инъекции у мышей собирали кровь, и мышей выводили из эксперимента. Селезенку забирали для выделения нейтрофилов как описано в п. 2.2.2.3. Печень (RLS₄₀) изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и анализировали, как описано в п. 2.2.9.4. Для исследования иммуномодулирующего действия ДНКазы I на модели RLS₄₀ у мышей извлекали тимус и фиксировали в 10%-ном формалине для последующего патоморфологического исследования органов.

Индекс ингибирования метастазов в печени мышей с RLS₄₀ исследовали методом морфометрии, как описано в п.2.2.9.4. Анализ крови проводили как описано в 2.2.9.5.

2.2.11. Поляризация нейтрофилов *in vitro*

Для эксперимента использовали нейтрофилы костного мозга здоровых мышей линии C57BL/6. Нейтрофилы выделяли методом отрицательной MC, как описано в п. 2.2.2.4. и культивировали в концентрации $(1 - 3) \times 10^6$ кл./мл в среде RPMI, содержащей 10% FBS, 1% раствор антибиотика и антимикотика, активаторы LPS (100 нг/мл), IFN- γ (50 нг/мл), IFN- β (100 нг/мл) и ингибитор апоптоза QVD-Qph (3 μ M). В качестве контроля использовали нейтрофилы, инкубированные в той же среде с ингибитором апоптоза, но

без активаторов. Инкубацию проводили в стандартных условиях в течение 24 ч. После инкубации клетки промывали и ресуспендировали в среде RPMI для последующего анализа.

2.2.12. Влияние нейтрофилов на жизнеспособность клеток меланомы B16

Жизнеспособность клеток линии меланомы B16 после инкубации с нейтрофилами оценивали с помощью МТТ теста [319]. Для этого клетки высаживали в 96-луночный планшет по 8×10^3 кл./лунку в среде DMEM, содержащей 10%-ную FBS и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика. Через 12 ч среду заменяли на среду RPMI содержащую поляризованные и контрольные (без поляризации) нейтрофилы. При посадке нейтрофилов к клеткам B16 соблюдали соотношения 1:1, 1:3 или 1:20 (B16: нейтрофилы). Инкубацию проводили в стандартных условиях в течение 24 ч. Затем к клеткам добавляли раствор МТТ до концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали в течение 3 ч в тех же условиях. Среду удаляли, образовавшиеся в клетках кристаллы формазана растворяли в 100 мкл DMSO и измеряли оптическую плотность по разности поглощения на длинах волн $\Delta(\lambda 570 - \lambda 630)$ нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan RC. Данные представляли в виде процента живых клеток относительно контроля.

2.2.13. Статистический анализ

Все эксперименты *in vitro* проводили не менее, чем в трех повторах. Все эксперименты *in vivo* проводили не менее, чем в двух повторах.

Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Фишера (Fisher LSD) или критерием Тьюки (Tukey) и критерий Краскела–Уоллиса (Kruskal-Wallis) с последующим тестом Данна (Dunn) для множественных сравнений. Значение $p \leq 0.05$ отражало статистически достоверные отличия. Для статистического анализа использовали программу STATISTICA 10.0 или GraphPad Prism 8.0.2.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Получение и характеристика нейтрофилов костного мозга и селезенки мыши

3.1.1. Поиск и оптимизация протоколов для выделения нейтрофилов костного мозга и селезенки мышей

Для выделения нейтрофилов человека и нейтрофилов костного мозга мыши существуют оптимальные протоколы, позволяющие получить популяцию нейтрофилов с высокой чистотой и жизнеспособностью [320,321], 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.

Модификации протоколов включали поддержание постоянного температурного режима и выполнение всех процедур при комнатной температуре, чтобы избежать активации нейтрофилов, вместо рекомендованного ранее температурного режима при +4°C. В протоколах центрифугирования в градиенте плотности обычно используют градиенты плотности таких растворов, как фиколл, перколл, Histopaque, Optiprep и Lympholyte. Нами был выбран фиколл, как наиболее универсальная среда, используемая для центрифугирования в градиенте плотности. Еще одной модификацией, позволившей увеличить жизнеспособность нейтрофилов, было использование свежеприготовленного буфера на основе гидрокарбоната натрия вместо рекомендованных коммерческих буферов для лизиса (см. материалы и методы, п. 2.1.4).

Выделение нейтрофилов в градиенте плотности проводилось с использованием двухслойного раствора на основе фиколла 1.077/1.119 г/мл (протокол 2СФ, адаптированный из [321]) или трехслойного раствора на основе фиколла 1.083/1.090/1.110 г/мл (протокол 3СФ, адаптированный из [322]) (Рис. 2, Б). Центрифугирование проводили при комнатной температуре, без ускорения и торможения, чтобы избежать смешивания слоев, добиться лучшего осаждения более флотиремых фракций нейтрофилов и избежать эрозии слоев. Также нами было проведено сравнение иммуномагнитных методов для выделения нейтрофилов: метод отрицательной иммуномагнитной селекции нейтрофилов с использованием набора EasySepTM Mouse Neutrophil Enrichment Kit (протокол ИНС) и метод положительной иммуномагнитной селекции нейтрофилов с использованием Dynabeads (протокол ИПС) (Рис. 2, В).

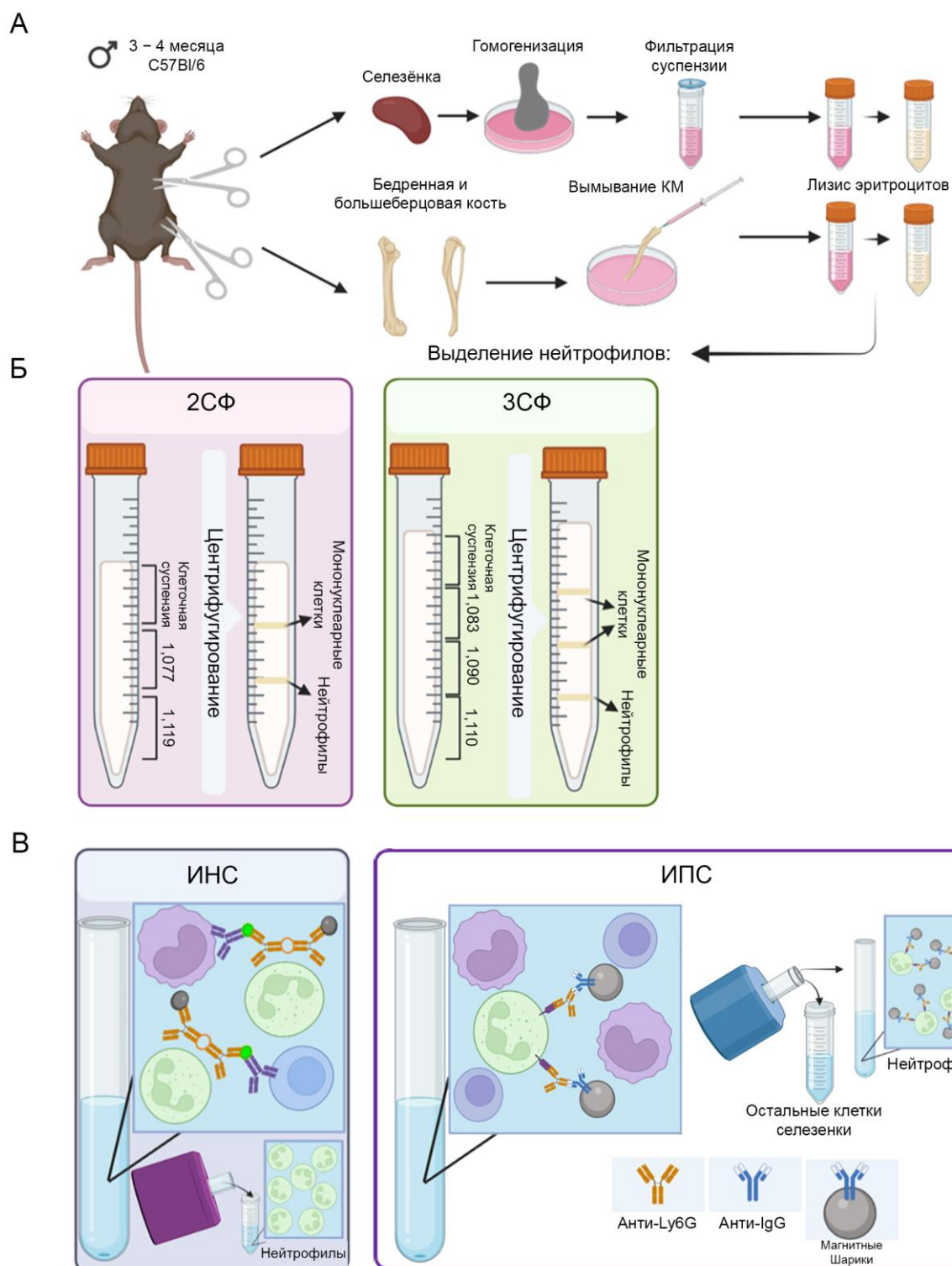


Рисунок 2. Схема различных протоколов выделения нейтрофилов из костного мозга и селезенки мышей, использованных в исследовании. **А.** Приготовление суспензии клеток костного мозга и селезенки. **Б.** Протоколы с использованием градиента плотности фикола. **В.** Иммуномагнитные протоколы.

3.1.2. Характеристика нейтрофилов, выделенных из костного мозга и селезенки

Нейтрофилы выделяли из костного мозга мышей C57Bl с использованием протоколов 2СФ/3СФ и иммуномагнитных протоколов. Чистоту выделенных

нейтрофилов оценивали с помощью проточной цитометрии. Нейтрофилы определяли как двойные положительные события $CD11b^+$ и $Ly6G^+$. Данные проточной цитометрии представлены на рисунке 3.

Было показано, что использование протоколов центрифугирования с использованием фиколла позволили получить нейтрофилы с высокой чистотой: $72.4 \pm 1.7\%$ для протокола 2СФ и $76.7 \pm 5.0\%$ для протокола 3СФ (Рис. 3, А, Б). Метод ИНС также привел к получению нейтрофилов с высокой чистотой: $80.3 \pm 0.3\%$ (Рис. 3, В). Следует отметить, что нейтрофилы с самой высокой чистотой были получены при использовании метода ИПС: чистота составила $99.3 \pm 0.3\%$ (Рис. 3, Г).

Далее из селезенки мышей C57BL/6 были получены спленоциты, нейтрофилы были выделены с использованием тех же четырех протоколов, которые были использованы для выделения нейтрофилов из костного мозга, и проанализированы методом проточной цитометрии (Рис. 4). Полученные данные показали, что нейтрофилы, выделенные из селезенки, характеризовались более низкой чистотой по сравнению с нейтрофилами, выделенными из костного мозга. Оказалось, что протоколы центрифугирования в градиенте фиколла не подходят для выделения нейтрофилов из селезенки: чистота образца составила всего 10% (Рис. 4, А, Б). Протокол ИНС позволил получить нейтрофилы с чистотой $48.6 \pm 4.3\%$ (Рис. 4, В). Протокол ИПС был наиболее эффективным: выделенные с его помощью нейтрофилы имели чистоту $98.7 \pm 0.5\%$ (Рис. 4, Г).

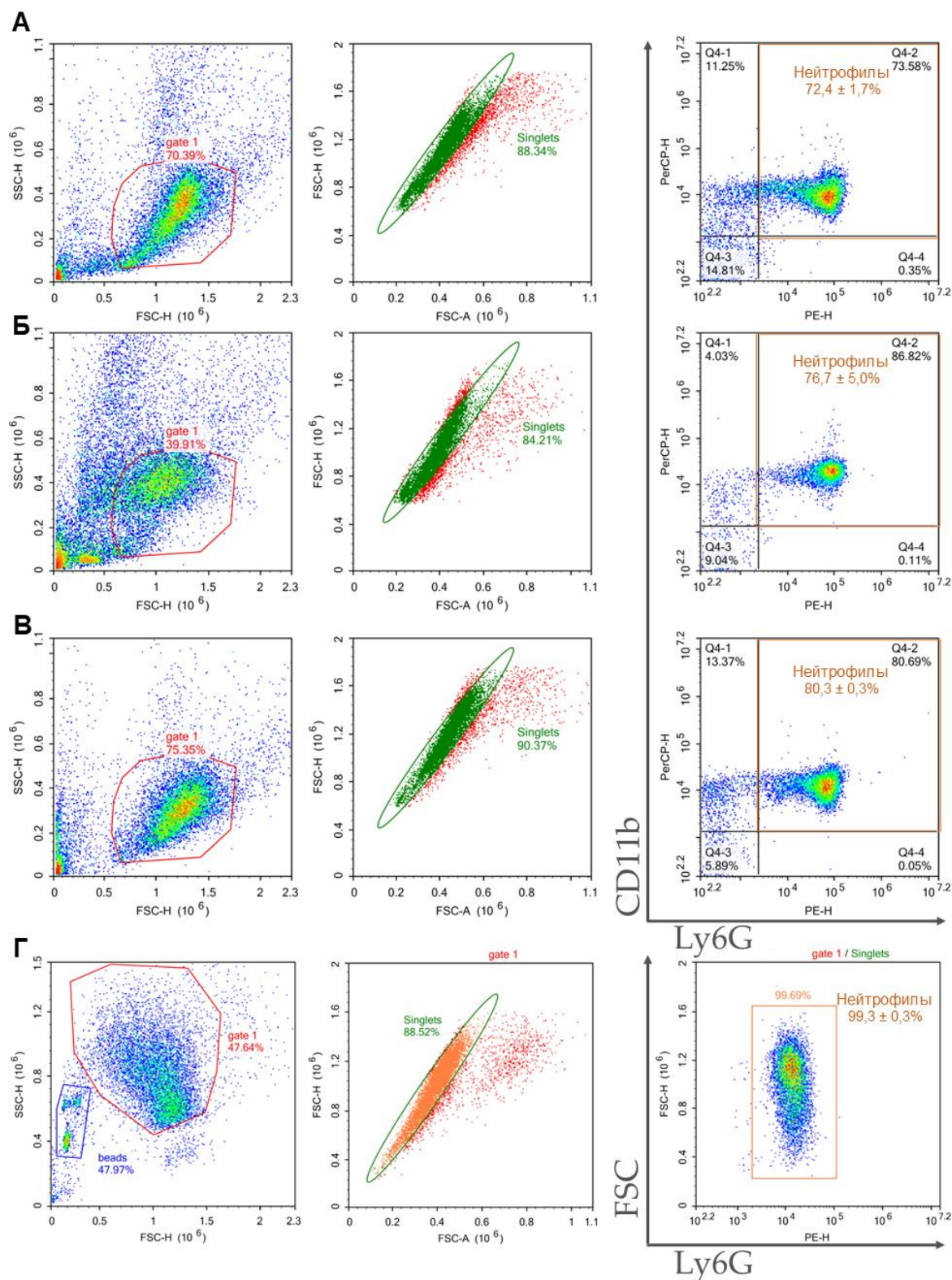


Рисунок 3. Точечные диаграммы стратегии гейтирования проточной цитометрии при исследовании нейтрофилов из костного мозга, выделенных с использованием протоколов 2СФ (А), 3СФ (Б), ИНС (В) и ИПС (Г). Дебрис был исключен. При исключении дебриса (ворота 1) единичные события (синглеты) были выбраны из точечного графика FSC-H относительно FSC-A. Нейтрофилы детектировали как двойные положительные события для CD11b⁺ (PerCP-Cy5.5) и Ly6G⁺ (PE).

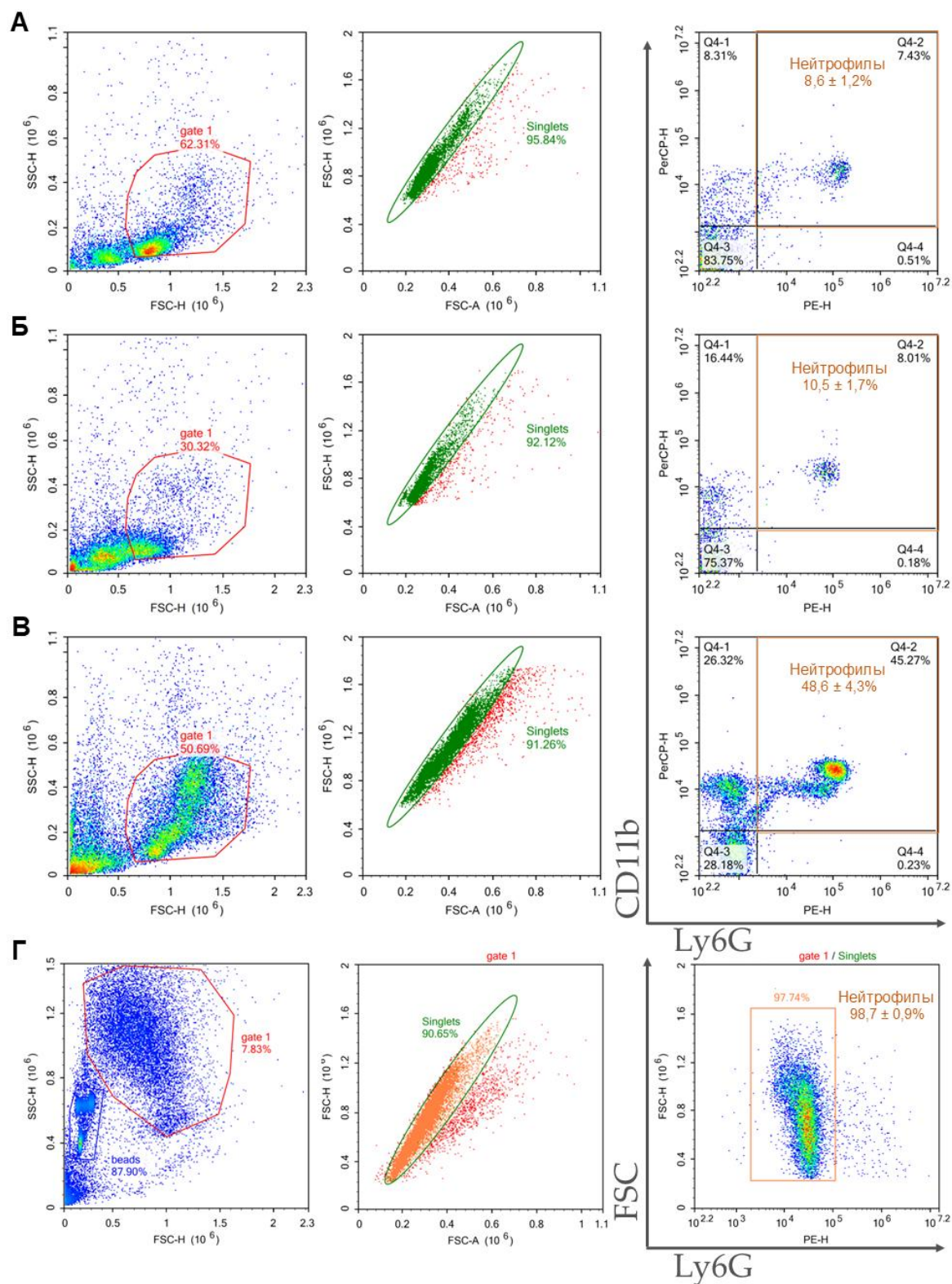


Рисунок 4. Точечные диаграммы стратегии гейтирования проточной цитометрии при исследовании нейтрофилов селезенки, выделенных с использованием протоколов 2СФ (А), 3СФ (Б), ИНС (В) и ИПС (Г). Дебрис был исключен. При исключении дебриса (ворота 1) единичные события (синглеты) были выбраны из точечного графика FSC-Н относительно FSC-А. Нейтрофилы детектировали как двойные положительные события для CD11b⁺ (PerCP-Cy5.5) и Ly6G⁺ (PE).

3.1.3. Сравнение чистоты, жизнеспособности и выхода нейтрофилов, выделенных из костного мозга и селезенки с использованием различных протоколов

Далее было проведено сравнение протоколов выделения нейтрофилов по таким параметрам как чистота, жизнеспособность и выход клеток, а также по стоимости (Таблицы 8 и 9).

Таблица 8. Характеристика образцов, выделенных из костного мозга здоровых мышей C57BL/6 с использованием разных протоколов.

Метод выделения	Чистота, %	Жизнеспособность, %	Выход клеток в образце, $\times 10^6$	Выход нейтрофилов, $\times 10^6$	Стоимость
2СФ	72.4 ± 1.7	89.8 ± 1.4	8.6 ± 2.8	6.3 ± 2.1	+
3СФ	76.7 ± 5.0	91.0 ± 2.9	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.04	++
ИНС	80.3 ± 0.3	94.3 ± 0.8	10.7 ± 1.1	8.6 ± 0.9	+++++
ИПС	99.3 ± 0.3	91.6 ± 0.3	4.3 ± 1.4	4.3 ± 1.4	+++

Как видно из представленных данных, протоколы 2СФ и 3СФ позволили получить образцы примерно одинаковой чистоты (75%). Протокол ИНС позволил получить образцы более высокой чистоты ($80.3 \pm 0.3\%$) (Таблица 8). Однако самая высокая чистота образца была достигнута при использовании протокола ИПС и составила $99.3 \pm 0.3\%$. Ни один из протоколов не повлиял на жизнеспособность клеток, которая составила приблизительно 90% во всех образцах. В таблице 8 приведены общий выход и выход нейтрофилов. Общий выход – это выход клеток, полученный после выделения нейтрофилов без учета чистоты образца. Выход нейтрофилов рассчитывался из общего выхода на основе чистоты. Как видно из таблицы 8, выход нейтрофилов увеличивается в порядке 3СФ << ИПС < 2СФ < ИНС. Наконец, исходя из более низкой стоимости протокола 2СФ по сравнению с ИНС, протокол 2СФ может быть рекомендован для выделения нейтрофилов из костного мозга.

Аналогичный анализ был проведен для нейтрофилов селезенки (Таблица 9). Полученные данные показали, что оба протокола с использованием градиента плотности позволили получить образцы с крайне низкой чистотой – около 10%. Следует отметить, что протокол ИНС, для которого показана высокая чистота при выделении нейтрофилов из костного мозга, при применении для выделения нейтрофилов из селезенки дает образцы нейтрофилов с чистотой всего 50% (Таблица 9). Жизнеспособность клеток немного различалась между протоколами от 74% до 89%, но была ниже, чем в образцах,

полученных из костного мозга. Следует отметить, что выход нейтрофилов был крайне низким для всех протоколов (Таблица 9). Учитывая низкое содержание нейтрофилов в селезенке здоровых мышей [323–325] и полученные данные о чистоте/жизнеспособности клеток, для выделения нейтрофилов из селезенки рекомендован протокол ИПС.

Таблица 9. 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, $\times 10^6$	Стоимость
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	+++

3.1.4. Оценка функциональной активности выделенных нейтрофилов селезенки мышей

Одним из важных функциональных тестов для нейтрофилов является проверка способности формировать NET. Протоколы градиента плотности в отличие от иммуномагнитных методов отрицательной селекции могут нарушить функциональность нейтрофилов при выделении, поэтому была изучена способность продуцировать NET у нейтрофилов костного мозга, выделенных по протоколу 2СФ. Нейтрофилы костного мозга, выделенные по протоколу 2СФ, обрабатывали 100 мкг/мл LPS, 50 или 500 нМ РМА, активатором протеинкиназы С [326], или 5 мкМ ионофора Ca^{2+} A23187 в течение 3 ч. Данные анализировали с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 5).

Из рисунка видно, что нестимулированные нейтрофилы имели сохраненную морфологию (Рис. 5, А). Полученные данные показали, что нейтрофилы способны высвобождать NET под действием физиологического активатора LPS (Рис. 5, Б) и химических активаторов РМА (Рис. 5, В, Г) и A23187 (Рис. 5, Д). LPS в высокой концентрации (100 мкг/мл) был менее эффективен в индуцировании нетоза (Рис. 5, Б) по сравнению с химическими активаторами. Обработка нейтрофилов 50 нМ РМА привела к образованию нитеподобных NET (Рис. 5, В).

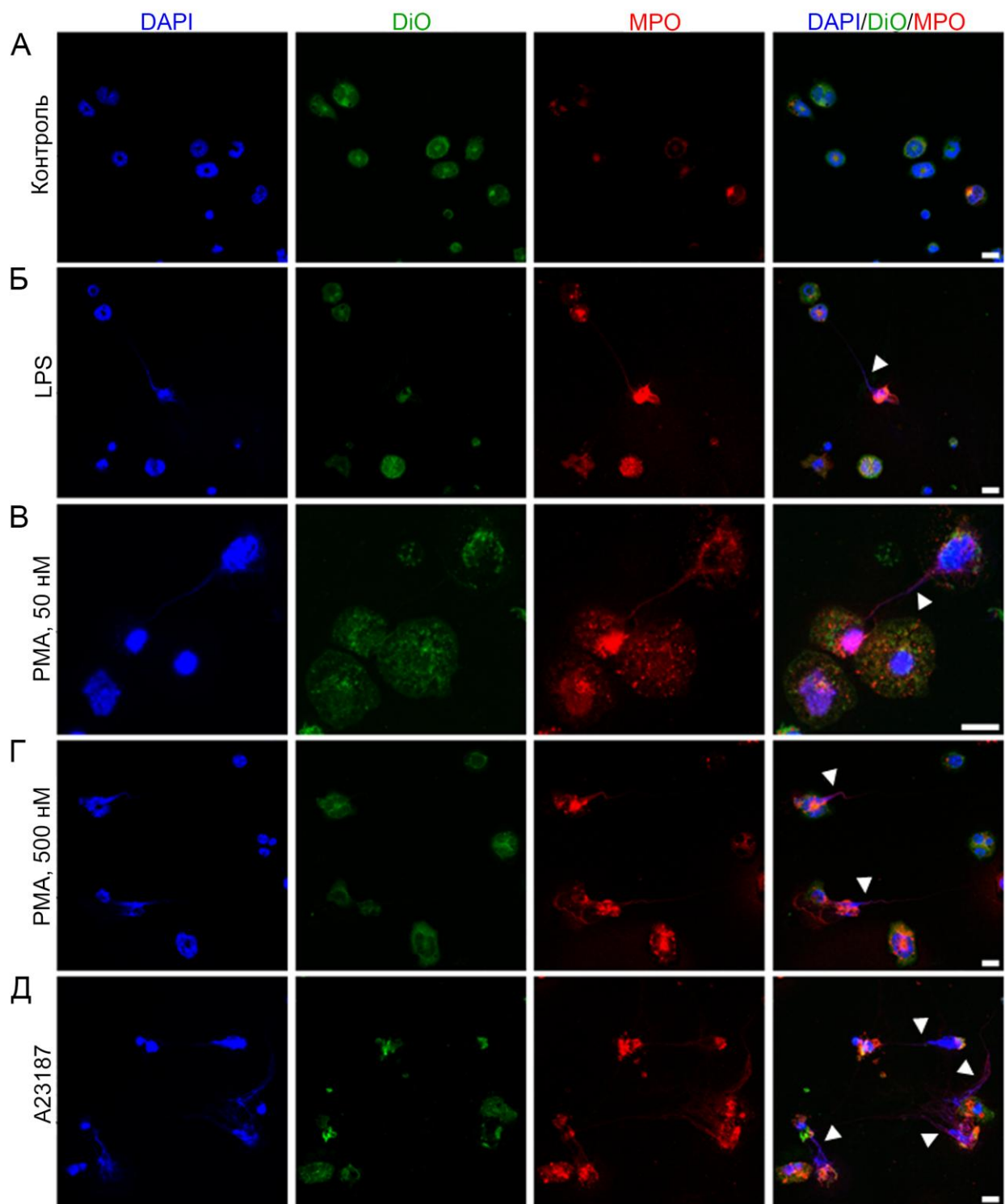


Рисунок 5. Формирование NET нейтрофилами костного мозга, выделенными по протоколу 2СФ. А. Нестимулированные нейтрофилы. Б. Нейтрофилы, стимулированные 100 мкг/мл LPS. В и Г. Нейтрофилы, стимулированные 50 и 500 нМ PMA, соответственно. Д. Нейтрофилы, стимулированные 5 мкМ A23187. DAPI – синий сигнал, ядра, DiOC6 – зеленый сигнал, мембраны, анти-MPO – красный сигнал, миелопероксидаза. Масштаб 10 мкм. Стрелки указывают на NET. Изображения были получены с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Обработка нейтрофилов 500 нМ РМА привела к значительным морфологическим изменениям: увеличению клеток и образованию пузырьков. В случае 500 нМ РМА, наряду с образованием филаментных NET было обнаружено увеличение ядер и диффузия хроматина (Рис. 5, Г), что можно описать как «диффузные» NET или «облако» хроматина, и это может быть ранним признаком нетоза [327–329] (Рис. 5, Г). Нитеподобные NET также были обнаружены в образцах, активированных A23187 (Рис. 5, Д). Нейтрофилы костного мозга, выделенные с использованием протокола ИНС, реагировали на активацию аналогично нейтрофилам костного мозга, выделенным с использованием протокола 2СФ, и в зависимости от активатора формировали схожие NET-структуры.

Иммуномагнитные методы положительной селекции также могут влиять на функциональность выделенных клеток, поскольку магнитные частицы связываются с белками клеточной мембраны, играющими роль в функционировании клеток. Нейтрофилы селезенки, выделенные по протоколу ИПС, обрабатывали 100 мкг/мл LPS, 50 или 500 нМ РМА, активатором протеинкиназы C [326], или 5 мкМ ионофора Ca^{2+} A23187 в течение 3 ч. Данные анализировали с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 6).

Полученные данные показали изменения в морфологии нейтрофилов в контрольных образцах без стимуляции, что подтвердило тот факт, что нейтрофилы, выделенные по протоколу ИПС, могут активироваться (Рис. 6, А). Обработка нейтрофилов селезенки LPS, РМА и A23187 привела к появлению изменений клеток, аналогичных изменениям нейтрофилов костного мозга, выделенных с использованием протокола градиента плотности (Рис. 6, Б-Д).

На рисунке 7 приведены данные конфокальной микроскопии как процент нейтрофилов, продуцирующих NET. Оказалось, что независимо от источника нейтрофилов или протокола выделения, не было выявлено увеличения образования NET под действием LPS по сравнению с контролем (Рис. 7). Нейтрофилы костного мозга, выделенные с использованием протоколов 2СФ или ИНС, реагировали на LPS и РМА аналогичным образом: LPS практически не оказывал стимуляции, РМА в концентрации 50 мкМ увеличивал процент нейтрофилов, формирующих NET, до 30-50%, тогда как при в концентрации 500 мкМ РМА эффект исчезал, по всей вероятности, в связи с переключением пути нетоза на апоптоз, некроптоз или иную форму клеточной гибели из-за высокой концентрации РМА.

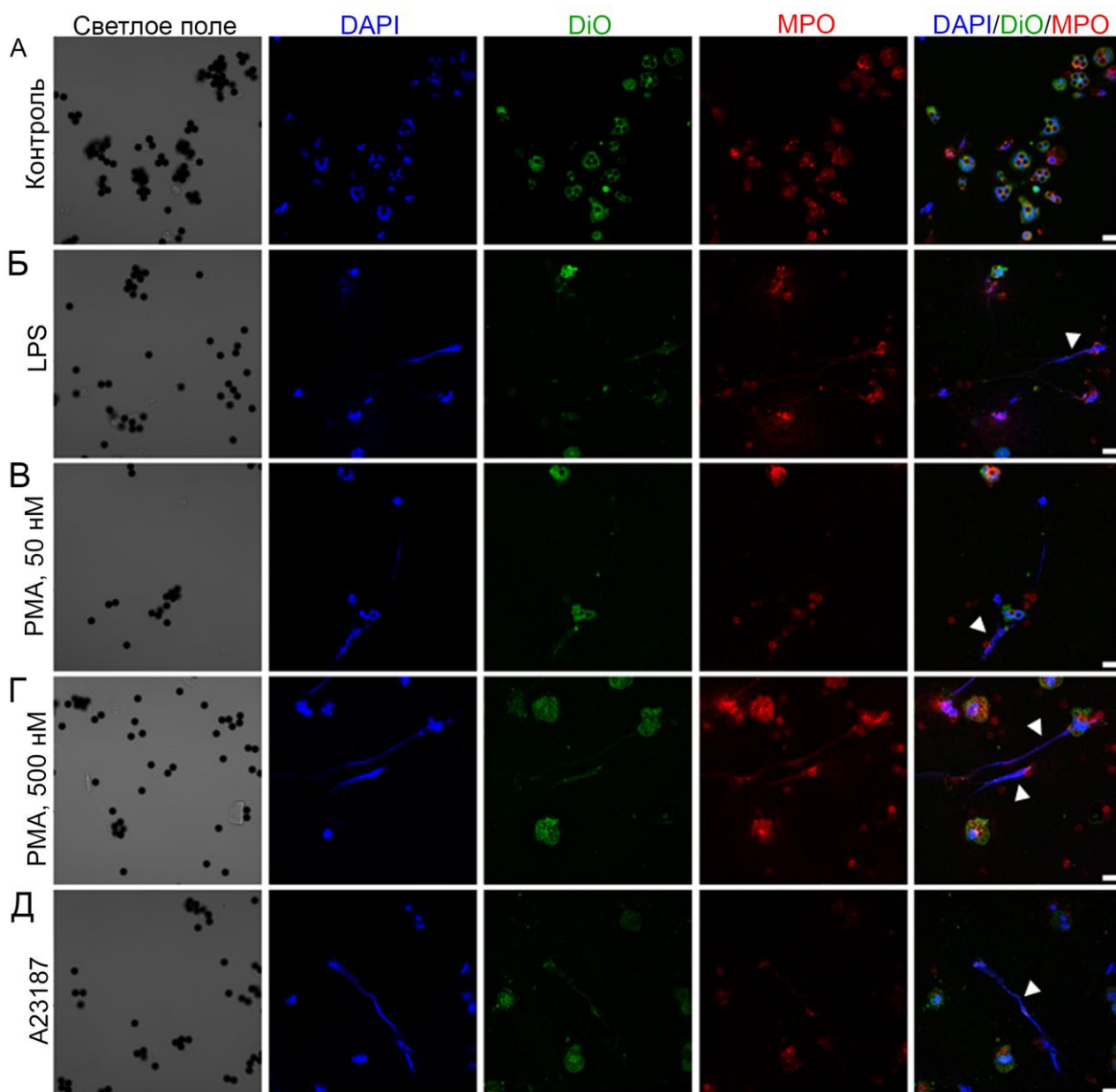


Рисунок 6. Формирование NET нейтрофилами селезенки, выделенными по протоколу ИПС. А. Нестимулированные нейтрофилы. Б. Нейтрофилы, стимулированные 100 мкг/мл LPS. В и Г. Нейтрофилы, стимулированные 50 нМ и 500 нМ PMA, соответственно. Д. Нейтрофилы, стимулированные 5 мкМ A23187. DAPI - синий сигнал, ядра, 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.

Обработка клеток A23187 приводила к высокому проценту нейтрофилов, формирующих NET: к 50% в случае нейтрофилов костного мозга, выделенных методом 2СФ, и до 85%; в случае нейтрофилов костного мозга, выделенных по протоколу ИНС (Рис. 7, А и Б).

LPS также не стимулировал нетоз в нейтрофилах селезенки (Рис. 7, В). PMA и A23187 вызывали увеличение процента нейтрофилов, образующих NET до 20–24% и 39%, соответственно, по сравнению с 10% в контроле. Тем не менее, нейтрофилы костного мозга не зависимо от протокола выделения реагировали на стимуляцию нетоза в 2 раза более эффективно.

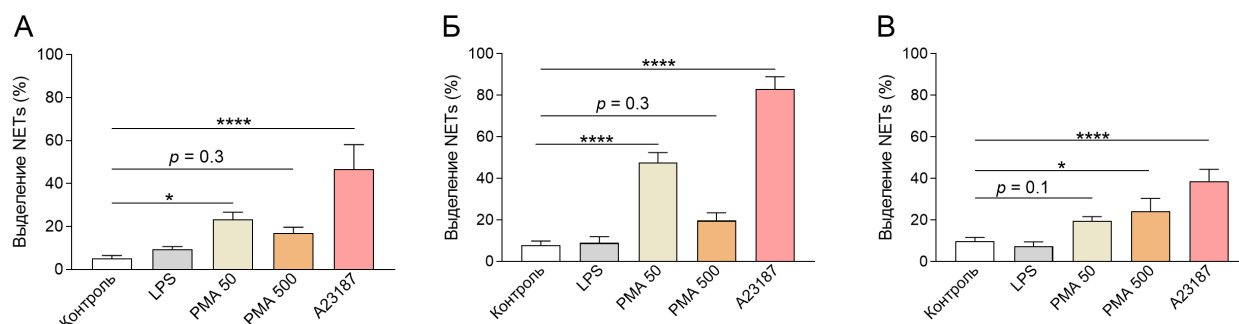


Рисунок 7. Процент нейтрофилов, формирующих NET в ответ на различные стимуляторы. **А.** Нейтрофилы костного мозга, выделенные с использованием протокола 2СФ. **Б.** Нейтрофилы костного мозга, выделенные с помощью протокола ИНС. **В.** Нейтрофилы селезенки, выделенные с помощью ИПС. Клетки стимулировались 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. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

Одним из критериев функциональной активности является продукция нейтрофилами ROS. Для этого нейтрофилы костного мозга, выделенные с использованием протокола 2СФ, и нейтрофилы селезенки, выделенные с использованием ИПС, 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. 8, А). Из представленных данных видно, что исходный уровень ROS в нативных нейтрофилах селезенки в 2–2.5 раза выше, чем в нативных нейтрофилах костного мозга (Рис. 8, Б), что может отражать тот факт, что часть нейтрофилов селезенки активированы. После стимуляции A23187 нейтрофилы костного мозга и селезенки продуцировали повышенное количество ROS, что говорит о сохранении функциональной активности выделенных нейтрофилов (Рис. 8, Б).

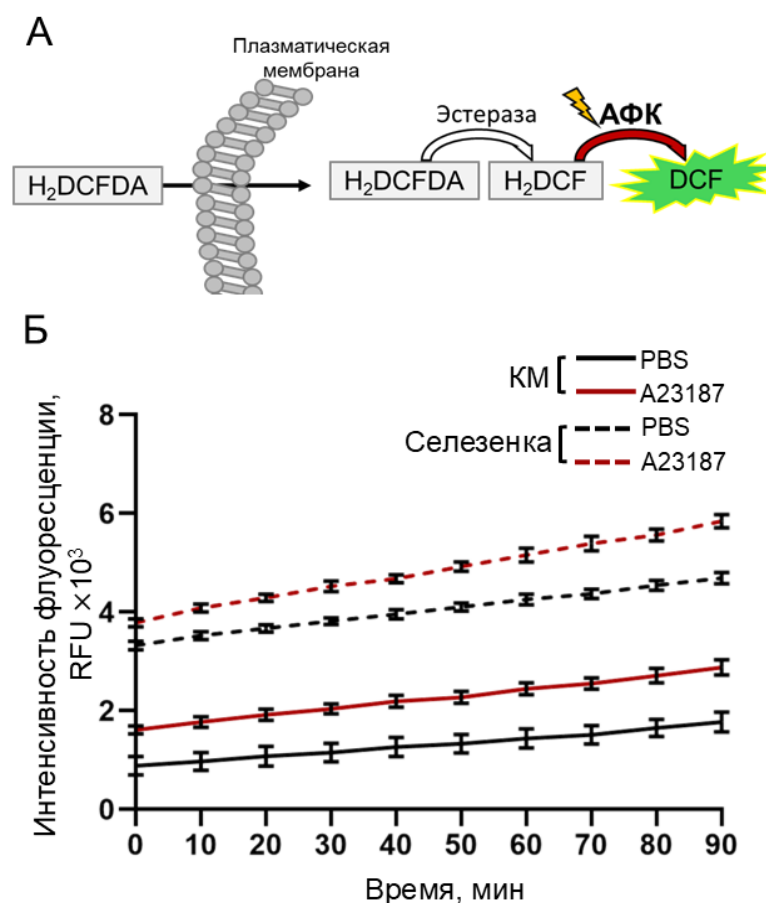


Рисунок 8. Продукция ROS нейтрофилами костного мозга и селезенки при стимуляции ионофором кальция A23187. Нейтрофилы костного мозга и селезенки мыши были обработаны 10 мкМ диацетата DCFDA и активированы 5 мкМ A23187. В качестве контроля использовали нативные нейтрофилы без стимуляции. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SD.

3.1.5. Обсуждение и заключение

Фенотип нейтрофилов селезенки может отражать фактический фенотип нейтрофилов в организме, поскольку селезенка считается одним из основных мест их миграции [15]. При развитии опухолевого процесса в селезенке могут накапливаться как новорекрутированные нейтрофилы из костного мозга, так и вторично мигрирующие нейтрофилы из опухолевых тканей. Таким образом, в селезенке могут быть обнаружены нейтрофилы, проявляющие характеристики TAN [16–19], что привлекло наше внимание. Однако, в литературе наблюдается не только недостаток данных о статусе нейтрофилов селезенки мышей-опухоленосителей и их функциональной активности, но и об оптимальных способах получения функциональных нейтрофилов селезенки.

В данном разделе работы было показано, что существующие протоколы выделения мышиных нейтрофилов не подходят для выделения нейтрофилов из селезенки. Был

разработан новый протокол выделения нейтрофилов селезёнки на основе ИПС, и проведён анализ функциональной активности выделенных нейтрофилов селезёнки.

Протоколы, предназначенные для выделения нейтрофилов из костного мозга и крови мыши, показали низкую эффективность при их применении для выделения нейтрофилов селезенки: чистота образца составила около 10% при центрифугировании в градиенте плотности и около 50% при ИНС (Таблица 9). Процент нейтрофилов в селезенке (<5%) гораздо меньше, чем процент нейтрофилов в костном мозге (20–40%) и крови (10–25%) [323,330–332], что объясняет, почему методы центрифугирования в градиенте плотности дают низкие выходы в случае селезенки.

Метод ИНС можно применять с расширением состава коктейля антител для удаления загрязняющих клеток (таких как, анти-CD3, анти-CD19 и анти-NK1.1) [325]. Эти модификации позволили бы повысить чистоту образцов, однако существенно увеличили бы стоимость такого подхода.

Наиболее оптимальным для выделения нейтрофилов селезенки оказался протокол ИПС. После мечения нейтрофилов антителами к специфическому маркеру Lyb6G возможно их выделение с помощью магнитных шариков, которые несут на себе антитела к IgG (Рис. 2, В). Таким образом, удалось выделить нейтрофилы селезенки не только высокой чистоты (Таблица 9), но и с сохранением функциональной активности. Так, было показано, что выделенные нейтрофилы способны к продукции ROS и нетозу.

Самым эффективным активатором для нейтрофилов показал себя A23187, который действует путем увеличения концентрации Ca^{2+} в цитозоле [333]. В ответ на A23187 около 50% нейтрофилов генерировали NET. Интересным фактом было то, что уровень спонтанно выделенных ROS в нейтрофилах селезенки был повышен, по сравнению с нейтрофилами костного мозга, что может отражать тот факт, что часть нейтрофилов селезенки активированы. В ответ на A23187 нейтрофилы селезенки вырабатывали большее количество ROS, что говорит о сохраненной функциональной активности выделенных нейтрофилов.

При активации нейтрофилов с помощью PMA также наблюдается образование NET у 20–30% нейтрофилов селезенки, однако, в ответ на LPS, компонент мембраны грамотрицательных бактерий, нетоза у нейтрофилов не наблюдалось. Способность LPS вызывать нетоз противоречива [334]. Эти противоречивые результаты можно объяснить структурным разнообразием LPS из разных штаммов бактерий, которые, как известно, вызывают разные иммунные ответы [328,335]. В нашем исследовании использовали LPS кишечной палочки серотипа O55:B5. Этот серотип не стимулировал нетоз в исследовании Питерса и др. [328].

Большим преимуществом данного протокола ИПС является возможность захвата всей популяции нейтрофилов вне зависимости от их статуса зрелости или плотности. Это особенно важно, поскольку LDN, которые часто ассоциируются с патологическими состояниями, такими как онкологические заболевания, присутствуют не только в периферической крови, но и в таких органах, как селезёнка [21,336]. Традиционные методы выделения нейтрофилов с помощью градиентного центрифугирования основаны на плотности клеток и часто исключают LDN из-за их изменённой плотности, что приводит к неполному представлению о составе нейтрофильной популяции. В отличие от этого, протоколы ИПС позволяют получить более полное и репрезентативное представление о фракции выделенных клеток.

Таким образом, можно заключить, что использование метода иммуномагнитной положительной селекции оправдано для получения чистой популяции жизнеспособных нейтрофилов селезенки мышей с сохранённой функциональной активностью.

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

3.2.1. Обоснование выбора референсных генов для нейтрофилов

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 [337,338]. 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 [337,339–343].

Вопрос выбора референсного гена особенно важен для нейтрофилов, поскольку нейтрофилы могут активно изменять свой транскриптом в ответ на незначительные сигналы окружающей среды [344]. 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 [340], 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.

Референсные гены для скрининга были выбраны на основе анализа литературных данных. Поскольку лишь в немногих работах есть упоминания о поиске оптимальных референсных генов для нейтрофилов мыши, были рассмотрены гены, рекомендованные для нейтрофилов других видов млекопитающих. Кроме того, в исследование были включены широко используемые референсные гены, применяемые в исследованиях на мышах. Для обеспечения разнообразия выбранных генов мы сосредоточились на подборе референсных генов, участвующих в различных клеточных процессах. Список генов и их функции приведён в Таблице 10.

Ортологи *Actb*, *Hprt1*, *Sdha*, *Tbp*, *B2m* и *Rack1* ранее использовали в качестве референсных генов для нейтрофилов человека [345,346]. *Ywhaz* был предложен в качестве референсного гена для лейкоцитов человека [314], и зарекомендовал себя в качестве хорошего референсного гена для нейтрофилов крупного рогатого скота и овец [347–350]. Ортолог *Rpl13a* ранее использовался в качестве референсного гена для нейтрофилов крупного рогатого скота [348]. *Eef2* является стабильно экспрессируемым референсным геном во всех тканях мышей без существенных различий в уровнях экспрессии [351]. *Gapdh* является одним из наиболее часто используемых референсных генов [352,353].

Таблица 10. Референсные гены, выбранные для скрининга.

Ген	Полное название/функция*	Эффективность RT-qPCR, %§	Коэффициент корреляции (R ²)
<i>Actb</i>	бета-актин движение клеток, формирование цитоскелета, межклеточная передача сигналов	104.39	0.9933
<i>Hprt1</i>	гипоксантинфосфорибозилтрансфераза 1 анаболизм пуринов	103.36	0.9991
<i>Gapdh</i>	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа углеводный обмен	97.24	0.9950
<i>Sdha</i>	сукцинатдегидрогеназный комплекс флавопротеиновой субъединицы А дыхательная цепь митохондрий	102.21	0.9979
<i>Ywhaz</i>	белок активации тирозин-3- монооксигеназы/триптофан-5- монооксигеназы передача сигнала путем связывания с фосфосерин-содержащими белками	97.83	0.9960

* Предоставлено порталом NCBI Gene portal; § Рассчитано методом стандартных кривых

Таблица 10. Референсные гены, выбранные для скрининга. (Продолжение)

Ген	Полное название/функция*	Эффективность RT-qPCR, %§	Коэффициент корреляции (R ²)
<i>Tbp</i>	ТАТА-бокс-связывающий белок инициация транскрипции РНК-полимеразой II	94.06	0.9949
<i>B2m</i>	бета-2 микроглобулин белок, ассоциированный с МНС II	99.5	0.9956
<i>Eef2</i>	фактор элонгации эукариот 2 GTP-связывающий фактор элонгации	94.81	0.9989
<i>Rpl13a</i>	рибосомальный белок L13a часть 60S-субъединицы	96.84	0.9970
<i>Rack1</i>	рецептор активированной С-киназы 1 белок малой рибосомальной субъединицы, передача внутриклеточных сигналов	90.29	0.9938

* Предоставлено порталом NCBI Gene portal; § Рассчитано методом стандартных кривых

3.2.2. Опухолевые модели, использованные в работе

Для выявления стабильно-экспрессируемых генов нейтрофилов, которые можно использовать в качестве референсных генов, была исследована экспрессия ряда потенциальных генов в нативных неактивированных незрелых нейтрофилах костного мозга здоровых мышей, относительно зрелых нейтрофилах селезенки и в нейтрофилах селезенки мышей-опухоленосителей, потенциально обладающих альтернативным статусом зрелости и активации. Для получения опухоль-ассоциированных нейтрофилов селезенки были использованы модели карциномы легких Льюис (LLC) и лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS₄₀.

LLC является воспроизводимой и хорошо зарекомендовавшей себя сингенной моделью рака легких мыши [354]. При внутримышечном введении LLC формирует первичный опухолевый узел и метастазирует в легкие. LLC имеет эпителиальное происхождение и сопоставима с раком легких человека.

RLS₄₀ была получена из резистентной лимфосаркомы RLS путём индукции устойчивости к винбластину [317]. Модель соответствует резистентной лимфосаркоме, резистентность которой развивается в ответ на несколько курсов химиотерапии. RLS₄₀ имеет гемопоэтическое происхождение, при внутримышечном введении формирует первичный опухолевый узел и метастазирует в печень [47].

Использованные модели также отличаются тем, что LLC является стабильной моделью, где у всех мышей без лечения развивается первичный опухолевый узел со стандартным размером (до 1 см³), однако, RLS₄₀ – более вариабельная модель, где

встречаются мыши с замедленным ростом опухоли (менее 0.1 см^3 , $\text{RLS}_{40}^{\text{Low}}$), также мыши с опухолями среднего (более 0.1 см^3 , но менее 1 см^3 , $\text{RLS}_{40}^{\text{Med}}$) и большого размеров (более 1 см^3 , $\text{RLS}_{40}^{\text{High}}$).

3.2.3. Профиль экспрессии референсных генов

Экспрессия 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, LLC (n=3), $\text{RLS}_{40}^{\text{Low}}$ (n=3) и $\text{RLS}_{40}^{\text{High}}$ (n=3).

Эффективность пар праймеров была рассчитана для обеспечения сопоставимости результатов RT-qPCR. Эффективность составила от 90.29% до 104.39% (Таблица 10), что находится в целевом интервале эффективности (90–110%) [355]. Более того, коэффициент корреляции R^2 составил от 0.9933 до 0.9991, что указывает на низкую изменчивость между повторами (Таблица 10).

Значения Ct для всех референсных генов находились в допустимом диапазоне < 40 (16.73–30.83) (Рис. 9). Самые высокие уровни экспрессии наблюдались для *B2m* ($\text{Ct}=18.08\pm0.70$), в то время как самые низкие уровни экспрессии наблюдались для *Sdha* ($\text{Ct}=27.96\pm1.29$) (Рис. 9).

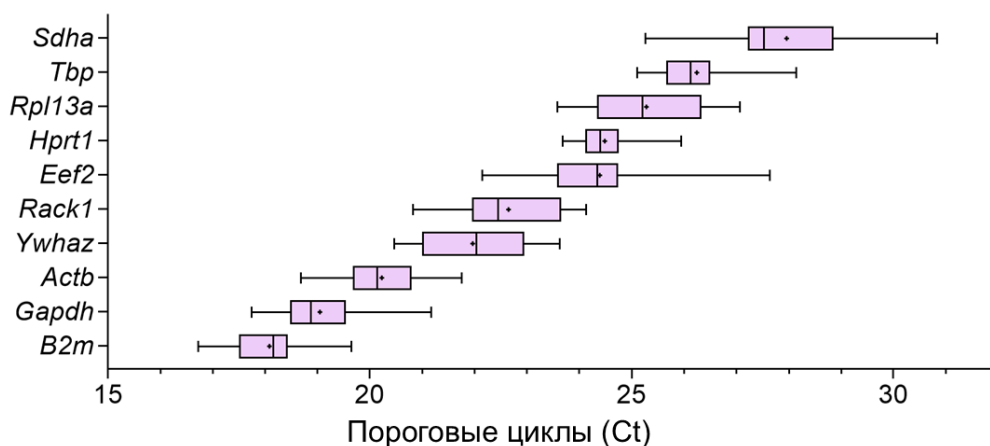


Рисунок 9. Пороговые циклы RT-qPCR для выбранных референсных генов в нейтрофилах, полученных из костного мозга и селезенки здоровых мышей и мышей с опухолями. Был проанализирован 21 образец: нейтрофилы селезенки мышей с LLC (n=3), мышей с $\text{RLS}_{40}^{\text{High}}$ (n=3) и мышей с $\text{RLS}_{40}^{\text{Low}}$ (n=3); нейтрофилы костного мозга и селезенки здоровых мышей линий C57Bl и CBA, соответственно, $2\times(n=3)$ и $2\times(n=3)$. Прямоугольники показывают межквартильный интервал между 25-м и 75-м перцентилями, а усы – интервал от минимального до максимального значения. Медиана обозначена линией, а символ “+” указывает на среднее значение.

3.2.4. Оценка стабильности экспрессии референсных генов

Для изучения стабильности экспрессии выбранных референсных генов использовали следующие биоинформатические инструменты и методы: BestKeeper [312], NormFinder [313], geNorm [314] и метод ΔC_t [315]. Для создания финального общего рейтинга использовалит RefFinder [316].

3.2.4.1 BestKeeper

Принцип работы BestKeeper заключается в том, что стабильно экспрессируемый референсный ген должен демонстрировать низкую вариацию уровней экспрессии в разных образцах из разных экспериментальных групп. В BestKeeper ранжирование референсных генов определяется стандартным отклонением (SD) и коэффициентом вариации (CV) (относительное стандартное отклонение) значений C_t , при этом гены, которые наиболее стабильно экспрессируются, показывают наименьшую вариацию. Любой ген с $SD > 1$ считается не соответствующим минимальным требованиям [312]. Кроме того, BestKeeper предоставляет описательный анализ изученного набора образцов, включая геометрическое и арифметическое средние значения C_t референсных генов и минимальные и максимальные значения C_t . Статистика, предоставленная BestKeeper, и ранжирование генов от наиболее к наименее стабильному (от 1 до 10) представлены в Таблице 11. Как упоминалось ранее, экспрессия *B2m* была самой высокой, тогда как экспрессия *Sdha* была самой низкой (Таблица 11). Референсными генами с самой низкой вариацией оказались *Hprt1*, *B2m* и *Tbp*, тогда как самую высокую вариацию показали гены *Eef2*, *Rpl13a* и *Sdha* (Таблица 11). Все значения SD экспрессии референсного гена были менее 1, за исключением *Sdha* ($SD = 1.02$).

Таблица 11. Описательная статистика и анализ стабильности, рассчитанные BestKeeper.

	<i>Actb</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Sdha</i>	<i>Ywhaz</i>	<i>Tbp</i>	<i>B2m</i>	<i>Eef2</i>	<i>Rpl13a</i>	<i>Rack1</i>
Гео среднее значение [C_t]	20.21	24.48	19.03	27.93	21.94	26.23	18.07	24.36	25.26	22.63
Ари среднее значение [C_t]	20.23	24.48	19.05	27.96	21.97	26.24	18.08	24.39	25.28	22.65
min [C_t]	18.69	23.68	17.74	25.26	20.47	25.10	16.73	22.15	23.58	20.82
max [C_t]	21.76	25.94	21.17	30.83	23.63	28.14	19.65	27.64	27.07	24.13
SD [$\pm C_t$]	0.63	0.35	0.63	1.02	0.88	0.57	0.55	0.94	0.95	0.81
CV [% C_t]	3.13	1.43	3.33	3.64	3.98	2.18	3.07	3.87	3.74	3.59
Ранжирование	4	1	5	10	7	3	2	8	9	6

Гео – геометрическое, Ари – арифметическое, SD – стандартное отклонение, CV – коэффициент вариации.

3.2.4.2 NormFinder

Для интеграции межгрупповой вариации экспрессии изучаемых референсных генов использовали NormFinder [313]. Выборка была разделена на подгруппы в соответствии с источником нейтрофилов (костный мозг или селезенка), линии мышей (C57Bl или CBA) и моделью имплантированной опухоли (здоровые без опухоли, LLC, RLS₄₀^{High}, RLS₄₀^{Low}). *Tbp* и *Hprt1* оказались наиболее стабильно экспрессируемыми генами во всей выборке (Таблица S1, Рис. 10, А). При использовании более упрощенного подхода с разделением выборок на здоровых мышей и мышей с опухолями произошло изменение общего рейтинга, однако *Tbp* и *Hprt1* остались наиболее стабильно экспрессируемыми референсными генами (Таблица S2).

3.2.4.3 Метод ΔCt

Метод ΔCt основан на расчете ΔCt для каждой пары изученных референсных генов и вычисляет SD ΔCt для всех образцов. Затем гены ранжируются на основе среднего значения SD значений ΔCt , полученных для каждого гена из всех возможных комбинаций пар генов [315]. Чем ниже среднее значение SD значений ΔCt , тем стабильнее ген. По результатам такого подхода было показано, что *Tbp* и *Hprt1* являются наиболее стабильными генами со значением стабильности менее 1 (Рис. 10, Б, Таблица S3). Наименее стабильными генами были *Rpl13a* и *Rack1* (Рис. 10, Б, Таблица S3).

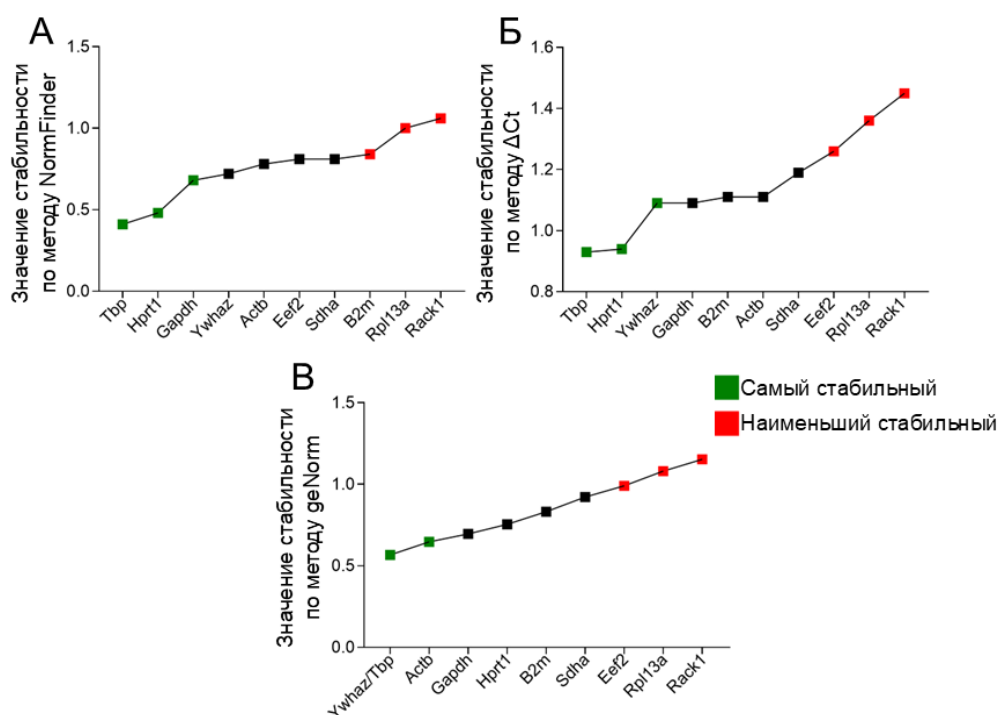


Рисунок 10. Стабильность экспрессии референсных генов. А. NormFinder. Б. ΔCt . В. geNorm.

3.2.4.4 geNorm

Метод geNorm позволяет вычислить попарную вариацию референсного гена по отношению ко всем другим референсным генам и устанавливает значение стабильности референсного гена (значение М) как среднюю попарную вариацию определенного гена со всеми другими референсными генами [314]. Алгоритм находит два гена, которые показывают наибольшую согласованность в экспрессии, и впоследствии определяет вариацию экспрессии всех других генов по отношению к этим двум выбранным. Таким образом, алгоритм всегда предлагает два гена с самым низким значением М, за которыми следуют гены с большими значениями М и более низкой стабильностью [314,356]. Основываясь на значениях М изучаемых генов, geNorm предложил *Ywhaz/Tbp* как наиболее стабильную пару, тогда как *Eef2*, *Rpl13a* и *Rack1* были наименее стабильно-экспрессируемыми референсными генами (Рис. 10, В, Таблица S4). Поскольку *Ywhaz* показал высокую вариацию в изученном наборе образцов (Таблица 11), мы предположили, что *Ywhaz* может коррелировать с *Tbp*, поскольку метод geNorm может ошибочно определять гены со случайно коррелирующей экспрессией как наиболее стабильно экспрессируемые [356]. Чтобы доказать эту гипотезу, была проведена корреляция Пирсона на линеаризованных значениях C_t для всех генов и образцов. Интересно, что высокая корреляция 0.87 наблюдалась между *Ywhaz* и *Tbp* с самым высоким показателем r Пирсона среди всех генов, что могло бы объяснить наблюдаемые противоречивые результаты (Рис. 11, Таблица S5). Другая пара с показателем r Пирсона 0.87 — это гены *Actb* и *Gapdh*, которые располагаются сразу после *Ywhaz/Tbp* в рейтинге.

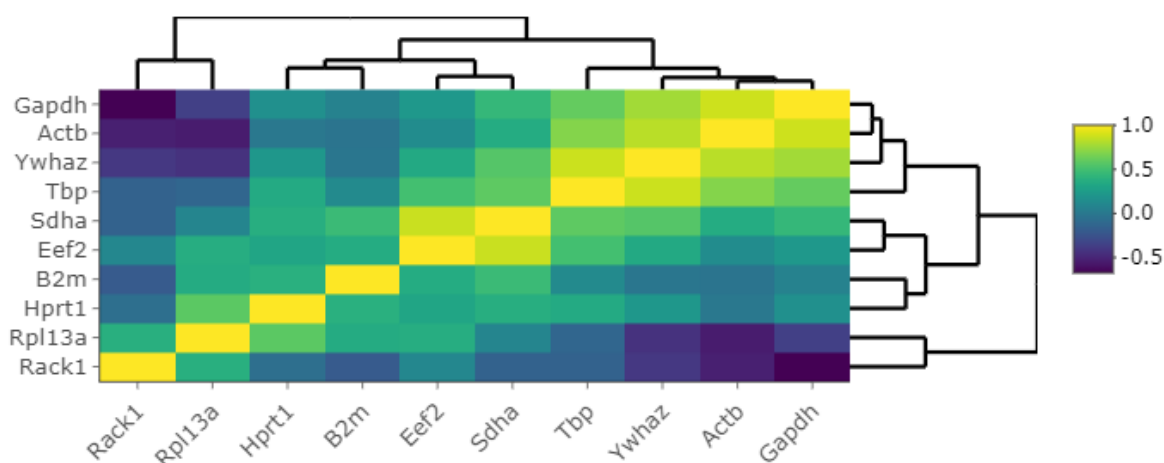


Рисунок 11. Тепловая карта корреляции Пирсона линеаризованных значений C_t (2^{-C_t}) изучаемых референсных генов. Значения, используемые в цветовой схеме, представляют значения r Пирсона.

3.2.4.5 RefFinder

Для обобщения полученных результатов был использован алгоритм RefFinder, который вычисляет среднее значение рейтингов, присвоенных каждому гену в каждом из четырех алгоритмов [316]. Алгоритм RefFinder гарантирует, что каждый используемый метод (BestKeeper, NormFinder, метод ΔCt и geNorm) вносит равный вклад в итоговый общий рейтинг. С помощью RefFinder гены *Tbp* и *Hprt1* были идентифицированы как лучшие референсные гены для нейтрофилов мыши (Таблица 12, Таблица S6). Наименее стабильно экспрессируемыми референсными генами в нейтрофилах оказались гены *Rack1* и *Rpl13a* (Таблица 12, Таблица S6).

Таблица 12. 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

3.2.5. Обсуждение и заключение

В данном разделе были идентифицированы оптимальные референсные гены, которые можно использовать для исследования нейтрофилов мыши независимо от их активационного статуса.

При использовании RT-qPCR для характеристики клеточного фенотипа крайне важно выбрать подходящий референсный ген для нормализации данных. Использование неподходящего референсного гена может привести к ошибочной интерпретации данных RT-qPCR. Референсный ген должен стабильно экспрессироваться независимо от типа исследуемой популяции клеток и модели патологии. Это особенно важно для

исследования иммунных клеток, поскольку их активационный статус и степень созревания могут влиять на стабильность экспрессии референсных генов [340].

Вопрос выбора референсного гена для нейтрофилов особенно важен по нескольким причинам: во-первых, склонность к лабильности транскриптома в ответ на сигналы окружающей среды при относительной бедности общего пула мРНК [344]; во-вторых, очевидная непригодность некоторых обычно используемых референсных генов, поскольку их экспрессия может изменяться при клеточной активации. Например, при активации нейтрофилов резко повышается подвижность клеток, и в этих процессах участвует β -актин, продукт *Actb*, что является важной особенностью нейтрофилов [357]. Более того, β -актин контролирует соотношение G-актина в клетке, что является важным аспектом активации нейтрофилов в процессе при нетозе [357,358].

В ряде исследований были описаны оптимальные референсные гены для нейтрофилов человека и других млекопитающих [345–350]; однако было отмечено отсутствие данных о референсных генах для нейтрофилов мыши, что является существенным ограничением для характеристики нейтрофилов мыши методом RT-qPCR.

Исследуемые референсные гены *Tbp*, *Hprt1*, *Ywhaz*, *B2m*, *Gapdh*, *Actb*, *Sdha*, *Eef2*, *Rack1* и *Rpl13a* были выбраны на основе скрининга референсных генов для нейтрофилов разных видов [314,345–353]. Мы сосредоточились на включении референсных генов, кодирующих белки разных семейств с различными функциями, чтобы обеспечить разнообразие и минимизировать вероятность совместной регуляции изучаемых генов [315] (Таблица 10).

В качестве экспериментальных моделей были выбраны опухоли LLC и RLS₄₀. Предполагалось, что в этих двух моделях нейтрофилы селезенки могут иметь иные профили и функциональные состояния, чем нейтрофилы, полученные из селезенки и костного мозга здоровых мышей. И даже между подгруппами RLS₄₀ (RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{High}) нейтрофилы могут иметь различные фенотипы. Поэтому, если референсные гены экспрессируются одинаково во всех состояниях нейтрофилов от наивного до активированного при развитии опухолей различного происхождения, то их можно считать стабильно экспрессируемыми референсными генами.

Для анализа стабильности экспрессия генов были использованы следующие биоинформатические инструменты и методы: BestKeeper [312], NormFinder [313], geNorm [314] и метод ΔC_t [315]. Для создания финального общего рейтинга использовали RefFinder [316].

Различия в ранжировании референсных генов, полученном с помощью различных инструментов, обусловлены фундаментальными различиями в принципах работы

алгоритмов, что подчеркивает необходимость глубокого понимания особенностей каждого алгоритма при интерпретации и сравнении результатов. Метод BestKeeper базируется на анализе общей дисперсии отдельных генов и является единственным подходом, при котором ранжирование одного гена не зависит от других генов. В контексте анализа значений стандартного отклонения (SD) Ct, гены *Hprt1*, *B2m* и *Tbp* продемонстрировали минимальную вариабельность среди исследованных генов (Таблица 11).

В рамках нашего экспериментального протокола возникла необходимость применения NormFinder — более комплексного и учитывающего межгрупповую дисперсию инструмента, обеспечивающего выбор референсного гена с минимальной вариабельностью не только по общей экспрессии, но и в пределах различных подгрупп образцов. Выбор подгрупп, отражающих нейтрофилы в состоянии покоя и активации, является критически важным для адекватного отбора референсных генов, специфичных для иммунных клеток [340]. При анализе с использованием NormFinder гены *Tbp* и *Hprt1* продемонстрировали наивысшую стабильность экспрессии, тогда как *B2m* утратил свои лидирующие позиции вследствие высокой межгрупповой дисперсии (Рис. 10А, Таблицы S1 и S2). Полученные данные коррелируют с предыдущими результатами, фиксирующими различия в экспрессии *B2m* между группами здоровых животных и опухоленосителей (Рис. S1Ж и S2Ж), что свидетельствует о существенном влиянии опухолевого процесса на стабильность экспрессии данного гена.

Попарные методы анализа, такие как geNorm и Δ Ct, могут приводить к ошибочным выводам при наличии корреляции экспрессии между генами в исследуемом наборе [356]. Это было продемонстрировано на примере гена *Ywhaz*, обладающего высокой вариабельностью экспрессии (Таблица 11), однако согласно методу Δ Ct *Ywhaz* был классифицирован как один из наиболее стабильных генов и занимал верхние позиции в парном ранжировании согласно geNorm (Рис. 10Б и В, Таблицы S3 и S4). Данная ситуация обусловлена высокой степенью корреляции экспрессии между генами *Tbp* и *Ywhaz*, выявленной в анализе (Таблица S5, Рис. 11), что представляет собой методологическое ограничение для применения geNorm и Δ Ct. Эта корреляция, вероятно, объясняется сходным профилем экспрессии данных генов (Рис. S2Д и Е и Рис. S3Д и Е).

Важно отметить, что отсутствует значимая корреляция экспрессии между двумя наиболее стабильно экспрессируемыми генами по результатам Δ Ct (*Tbp* и *Hprt1*), при коэффициенте корреляции Пирсона $r = 0,34$ (Таблица S5, Рис. 11). Более того, экспрессия *Hprt1* не коррелировала ни с одним из остальных исследованных генов и демонстрировала низкую вариабельность в изучаемых образцах (Таблица S5, Рис. 11). Таким образом, в

алгоритмах ΔC_t и geNorm возможна переоценка стабильности гена *Ywhaz* из-за его корреляции с *Tbp* (Таблица S5, Рис. 11).

В рамках нашего набора образцов применение RefFinder позволило провести всесторонний комплексный анализ общего ранжирования, хотя в более гетерогенной выборке его результаты могут быть затруднительными для интерпретации, поскольку метод основан исключительно на геометрическом среднем значений рангов. RefFinder, как и большинство других алгоритмов, определил *Tbp* и *Hprt1* в качестве наиболее стабильно экспрессируемых референсных генов в нейтрофилах мышей, тогда как *Rack1* и *Rpl13a* оказались наименее стабильно экспрессируемыми генами (Таблица 12, Таблица S6).

Таким образом, 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 12). Экспрессия *Tbp* и *Hprt1* является стабильной в нейтрофилах мышей вне зависимости от их активации или источника.

3.3. Фенотип нейтрофилов селезенки мышей с различными типами опухолей

3.3.1. Опухолевые модели

В работе использовались три типа опухолевых моделей: карцинома легких Льюис (LLC), лекарственно-устойчивая лимфосаркома RLS₄₀ и меланома B16. Схема эксперимента представлена на рисунке 12.

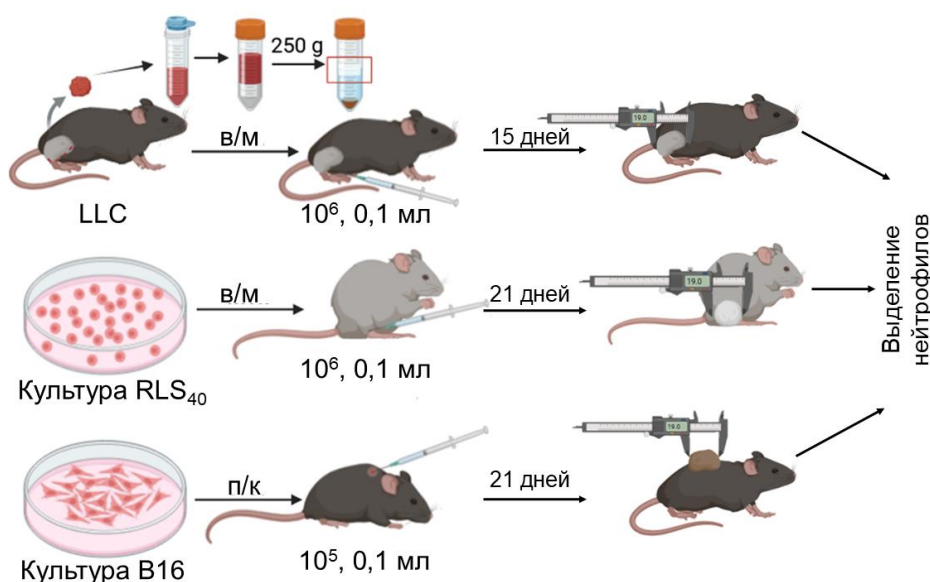


Рисунок 12. Опухолевые модели и дизайн эксперимента. Клетки LLC имплантировали в/м (10^6 кл. в 0.1 мл PBS) мышам C57Bl. Клетки RLS₄₀ (10^6 кл. в 0.1 мл PBS) имплантировали в/м мышам CBA. Клетки B16 (10^5 кл. в 0.1 мл PBS) имплантировали подкожно мышам C57Bl/6.

LLC и RLS₄₀ при внутримышечном введении формировали первичный опухолевый узел и метастазировали в легкие и печень, соответственно. Модель меланомы B16 с первичным опухолевым узлом формировалась путем подкожной имплантации клеток B16 в холку мышам C57Bl с образованием опухолевого узла так же, как и в случае RLS₄₀, с высокой вариабельностью размера.

На 21-ый день роста опухоли мыши 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, мыши с B16 были разделены на подгруппы: B16^{Low} (опухолевый узел менее 0.1 см³) и B16^{High} (опухолевый узел более 1 см³).

Клетки LLC и RLS₄₀ имплантировали внутримышечно мышам C57Bl и CBA, соответственно. Клетки B16 имплантировали подкожно мышам C57Bl. 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.

3.3.2. Влияние типа опухоли на фенотип нейтрофилов

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.

С помощью проточной цитометрии был определен процент нейтрофилов, экспрессирующих на своей поверхности молекулы CD40, FAS, ICAM-1, IFN γ R1 и PD-L1 среди всех нейтрофилов селезенки. Среди этих молекул CD40, FAS, ICAM-1 и IFN γ R1 характеризуются как маркеры N1-фенотипа, тогда как PD-L1 классически относят к маркерам N2-фенотипа [359].

Гены для анализа с помощью RT-qPCR были выбраны на основе их принадлежности к одной из групп маркеров: маркеры, связанные с воспалением (противовоспалительные проопухолевые маркеры *Ccl17*, *Il10*, провоспалительный противоопухолевый *Tnfa* и *Icam1*, продукт которого поддерживает адгезию и миграцию нейтрофилов), маркеры, связанные с апоптозом или с нетозом (*Fas* и *Cd274* (PD-L1) – лиганды апоптоза, а продукт *Sirt1* подавляет нетоз), проангиогенные и регенеративные маркеры (*Vegfa*, *Mmp9*, *Vegfr1*, *Hgf*), а также гены-участники путей передачи сигналов (*Ern1*, *Stat3*).

3.3.2.1. 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 здоровых мышей (С, здоровый контроль) (Рис. 13, А, Таблица S7). Этот результат согласуется с данными RT-qPCR, где уровень мРНК *Cd274* (*Pd-11*) увеличивался 23-кратно по сравнению со здоровым контролем (23.3 ± 16.3 vs 1.3 ± 0.2) (Рис. 13, Г, Таблица S8). Более того, при развитии LLC наблюдали увеличение уровня мРНК *Il10* в 78 раз (78.4 ± 25.2 , $C=4.1 \pm 1.2$) и уровня мРНК *Icam1* в 26 раз по сравнению с нейтрофилами КМ (26.6 ± 17.0 , $C=0.3 \pm 0.1$) (Рис. 13, В, Таблица S8). При этом популяция ICAM-1⁺ нейтрофилов возрастала незначительно по сравнению с нейтрофилами КМ и селезенки (С) здоровых мышей ($2.0 \pm 0.9\%$ vs $0.4 \pm 0.1\%$ и $0.5 \pm 0.03\%$ соответственно) (Рис. 13, А, Таблица S7).

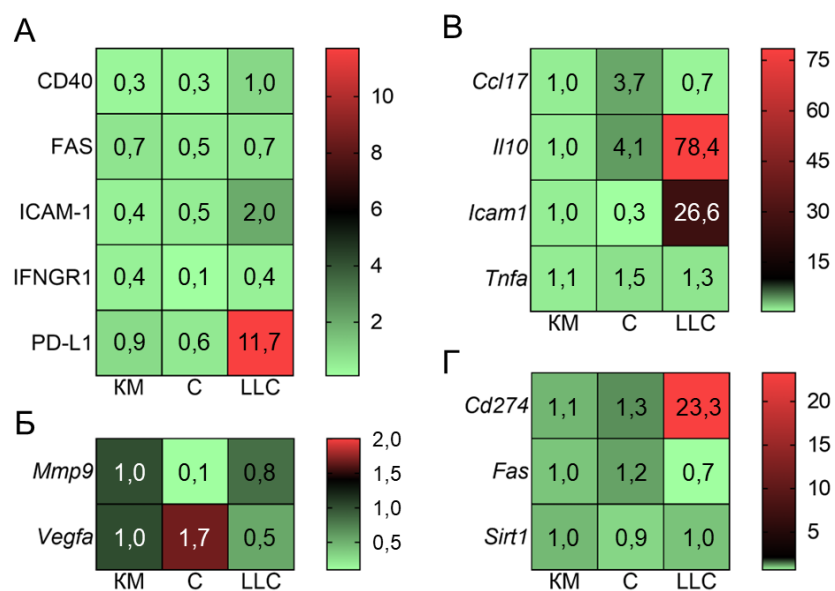


Рисунок 13. Фенотип нейтрофилов мышей с LLC. **А.** Тепловая карта данных проточной цитометрии. Результаты представлены как % от популяции нейтрофилов Ly6G⁺. Относительный уровень мРНК проангиогенных и регенеративных маркеров (**Б**), воспалительных маркеров (**В**), маркеров, связанных с апоптозом/некрозом (**Г**). Повышение и снижение экспрессии белковых маркеров или уровня мРНК показано диапазоном красного и зеленого цветов, соответственно. Контроли: КМ – нейтрофилы костного мозга, здоровых мышей C57Bl, С – нейтрофилы селезенки здоровых мышей C57Bl, LLC – нейтрофилы селезенки мышей с LLC. Результаты представлены как Mean. Тепловая карта с градиентом окраски от зеленого к красному, где зеленый цвет соответствует низким значениям, а красный – высоким значениям.

3.3.2.2. Фенотип нейтрофилов селезенки мышей с B16

Перед анализом фенотипа нейтрофилов мышей с B16 разделили на две подгруппы соответственно размеру опухоли: подгруппа B16^{Low} с опухолевым узлом размером менее 0.1 см³ и подгруппа B16^{High} с опухолевым узлом размером более 1 см³. Анализ нейтрофилов с помощью проточной цитометрии 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} (Рисунок 14, А).

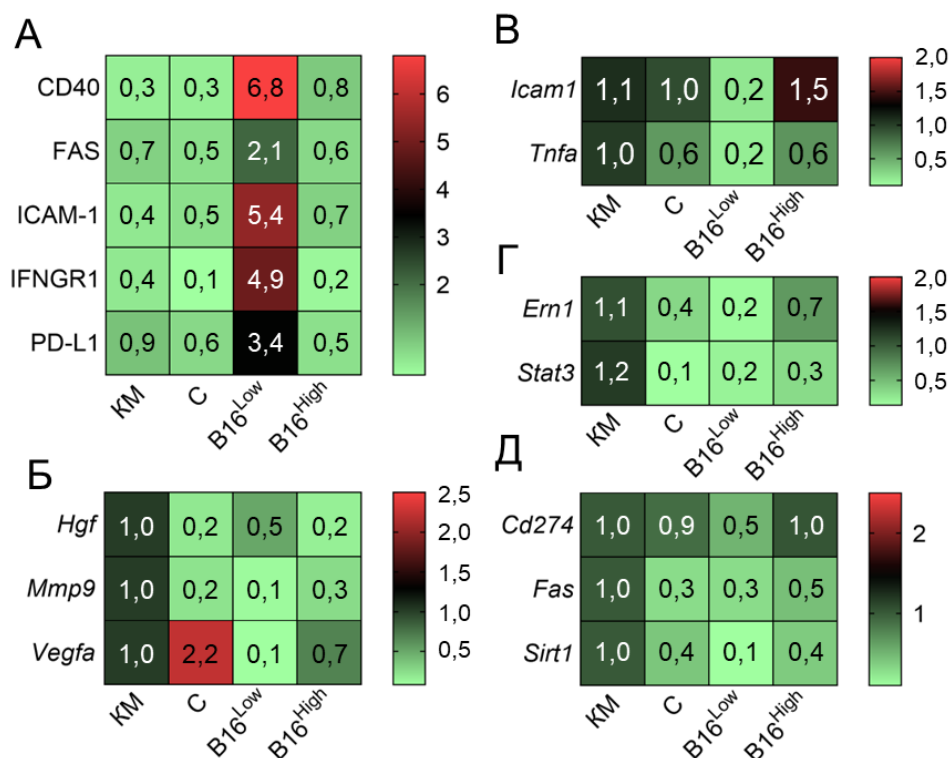


Рисунок 14. Фенотип нейтрофилов мышей B16 в сравнении с фенотипом нейтрофилов костного мозга (KM) и селезенки (C) здоровых мышей. **А.** Тепловая карта результатов проточной цитометрии. Результаты представлены как % от популяции нейтрофилов Ly6G⁺. Относительный уровень мРНК проангиогенных и регенеративных маркеров (**Б**), воспалительных маркеров (**В**), генов-участников путей передачи сигналов (**Г**) и маркеров, связанных с апоптозом/некрозом (**Д**). 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 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. Результаты представлены как Mean. Тепловая карта с градиентом окраски от зеленого к красному, где зеленый цвет соответствует низким значениям, а красный – высоким значениям.

В подгруппе B16^{Low} наиболее сильно увеличивалась представленность популяции IFN γ R1⁺ нейтрофилов (4.9±0.2% vs 0.1±0.03%), CD40⁺ нейтрофилов (6.8±0.1% vs 0.3±0.02%) и ICAM-1⁺ нейтрофилов (5.4±0.04% vs 0.5±0.03%) по сравнению с

нейтрофилами селезенки здорового контроля (Рис. 14, А, Таблица S9). 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. 14, А, Таблица S9). 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. 14, Б – Д, Таблица S10). Стоит отметить, что уровень мРНК *Vegfa* снижался в подгруппах B16^{Low} и B16^{High} относительно нейтрофилов селезенки здоровых животных, но данные были статистически недостоверны (Рис. 14, Б, Таблица S10).

3.3.2.3. Фенотип нейтрофилов селезенки мышей с RLS₄₀

На 21 день после имплантации опухоли RLS₄₀ мыши были разделены на три подгруппы по размеру опухоли: RLS₄₀^{Low} – опухолевый узел ≤ 0.1 см³, RLS₄₀^{Med} – $0.1 < \text{опухолевый узел} < 1$ см³, и RLS₄₀^{High} – опухолевый узел ≥ 1 см³.

В отличие от других опухолевых моделей в модели 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. 15, А, Таблица S11). Однако уровень мРНК *Fas* в группе RLS₄₀^{Low} не отличался от его уровня в здоровом контроле (Рис. 15, Д, Таблица S12).

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. 15, А, Таблица S11). Полученные данные коррелировали с данными RT-qPCR, которые показали в подгруппах RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med} повышение уровня мРНК *Cd274* (*Pd-11*) примерно в 5 раз (25.0 ± 4.3 и 23.7 ± 1.2 , $C=4.4 \pm 0.5$) (Рис. 15, Д, Таблица S12).

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) (Рис.15, В, Таблица S12). Однако анализ с помощью проточной цитометрии не выявил изменений популяции ICAM-1⁺ нейтрофилов в подгруппах (Рис. 15, А, Таблица S11).

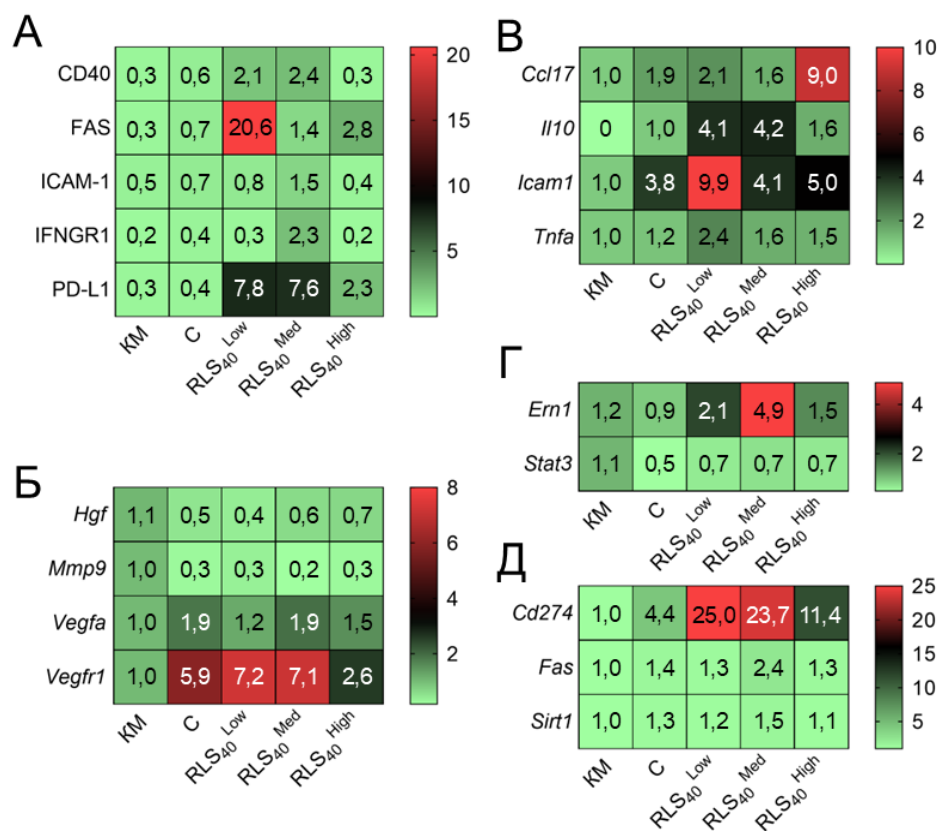


Рисунок 15. Фенотип нейтрофилов мышей с RLS₄₀. **А.** Тепловая карта результатов проточной цитометрии. Результаты представлены как % от популяции нейтрофилов Ly6G⁺. Относительный уровень мРНК проангиогенных и регенеративных маркеров (**Б**), воспалительных маркеров (**В**), генов-участников путей передачи сигналов (**Г**) и маркеров, связанных с апоптозом/некрозом (**Д**). 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. Результаты представлены как Mean. Тепловая карта с градиентом окраски от зеленого к красному, где зеленый цвет соответствует низким значениям, а красный – высоким значениям.

При анализе противовоспалительных проопухолевых факторов обнаружилось, что в подгруппах RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med} уровень мРНК *Il10* вырос в 4 раза относительно здорового контроля (4.1±0.9 и 4.2±0.01, C=1.0±0.2) и достоверно не изменился в группе RLS₄₀^{High} (Рис. 15, В, Таблица S12).

При анализе уровня мРНК регенеративных маркеров не было выявлено существенных изменений в экспрессии *Hgf*, *Mmp9* и *Vegfa*, однако экспрессия *Vegfr1*, продуктом которого является рецептор VEGF, недостоверно увеличивается в 7 раз в подгруппах RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med} по сравнению с нейтрофилами костного мозга (7.2 ± 2.1 и 7.1 ± 0.5 , КМ= 1.0 ± 0.2), однако сравнима с экспрессией в нейтрофилах селезенки здоровых животных ($C=5.9 \pm 0.1$) (Рис. 15, Б, Таблица S12).

При анализе генов-участников путей передачи сигналов было обнаружено, что только в подгруппе RLS₄₀^{Med} уровень мРНК гена *Ern1*, кодирующего сериновую/треониновую протеинкиназу, был повышен в 4.5 раза по сравнению со нейтрофилами селезенки здоровых мышей (4.9 ± 1.8 vs 0.9 ± 0.2) (Рис. 15, Г, Таблица S12), тогда как уровень мРНК сигнального белка и активатора транскрипции *Stat3* не изменялся.

3.3.3. Обсуждение и заключение

В данном разделе исследован фенотип нейтрофилов селезенки у мышей с опухолями различного происхождения LLC, RLS₄₀ и B16.

Используемые опухолевые модели имеют высокую значимость для изучения человеческих опухолей. LLC происходит из эпителиальных клеток, гомологична немелкоклеточному раку легкого человека и метастазирует в легкие [360]. B16 имеет нервное происхождение, представляет собой дегенерированные меланоциты и гомологична меланоме человека [361]. B16 известна своей низкой иммуногенностью и слабой инфильтрацией иммунных клеток [362,363]. Лимфосаркома RLS₄₀ имеет гематопозитическое происхождение и имитирует диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому у человека, характеризующуюся множественной лекарственной резистентностью [317,364]. Вместе эти модели можно рассматривать как ценные платформы для изучения биологии рака и оценки терапевтических стратегий, с прямой релевантностью к человеку.

Было обнаружено, что в селезенке мышей с LLC преобладает проопухолевая популяция нейтрофилов N2. Нейтрофилы мышей с LLC продемонстрировали высокую экспрессию противовоспалительных маркеров IL10 и PD-L1, которые являются медиаторами иммуносупрессии. IL10, продуцируемый TAN, способствует созданию иммуносупрессивного TME, ингибируя цитотоксические NK и CD8⁺ T-клетки [128,365]. В то же время PD-L1 может способствовать иммуносупрессии опухоли, индуцируя апоптоз в активированных T-клетках [366]. Интересно, что экспрессия других маркеров,

характерных для проопухолевых нейтрофилов человека, таких как MMP9, VEGFa и CCL17, обнаружена не была.

Противоопухолевый маркер N1 ICAM-1 был обнаружен на уровне мРНК, однако наблюдаемая популяция нейтрофилов ICAM-1⁺ была крайне мала (2%). ICAM-1 играет ключевую роль в адгезии нейтрофилов и связан с их противоопухолевым фенотипом [367]. Это подтверждает, что проопухолевые нейтрофилы преобладают на поздних стадиях развития опухоли, но противоопухолевые и транзиторные нейтрофилы, экспрессирующие как маркеры N1, так и N2, могут сосуществовать в селезенке.

В селезенках мышей с RLS₄₀ с опухолевым узлом > 1 см³ была обнаружена экспрессия маркеров, соответствующих иммуносупрессивному фенотипу: помимо PD-L1, была обнаружена экспрессия CCL17, но не IL10. CCL17 способствует иммуносупрессии опухоли, привлекая Treg в TME [130]. Также наблюдались повышенные уровни мРНК *Icam1* (маркер противоопухолевого фенотипа N1), хотя соответствующая популяция нейтрофилов ICAM-1⁺ не была обнаружена с помощью проточной цитометрии.

Однако в случае нейтрофилов селезенки мышей с RLS₄₀ ситуация с PD-L1 выглядит диаметрально противоположной. Высокая экспрессия этого маркера была обнаружена в группе RLS₄₀^{Low}, где была очевидная борьба иммунной системы с опухолью, что приводило к снижению опухолевого роста. По-видимому, экспрессия PD-L указывает на тонкую роль в модуляции активности нейтрофилов [124]. RLS₄₀, имеющая лимфоидное происхождение, экспрессирует PD-1 на поверхности, поэтому взаимодействие с PD-L1 может приводить к снижению пролиферации опухолевых клеток, что инициирует апоптоз или другие формы клеточной гибели и замедляет рост опухоли.

Кроме того, в группе RLS₄₀^{Low} помимо PD-L1 наблюдается повышение процента нейтрофилов, несущих на своей поверхности FAS, несмотря на отсутствие изменений в уровне мРНК *Fas* по данным RT-qPCR (вероятно, из-за короткой продолжительности жизни транскрипта). FAS считается противоопухолевым маркером нейтрофилов, который запускает апоптоз опухолевых клеток, взаимодействуя со своим лигандом FASL на опухолевых клетках [118–120]. Кроме того, FAS участвует в адгезии нейтрофилов и их передвижении по кровеносным сосудам посредством взаимодействия со своим лигандом на эндотелиальных клетках [368].

Важным наблюдением является незначительное изменение фенотипа нейтрофилов, выделенных от мышей с B16 (опухолевый узел ≥ 1 см³), где не было обнаружено значимого повышения экспрессии ни одного из исследованных генов. Таким образом, в модели B16 не наблюдалось общей закономерности, наблюдаемой в моделях RLS₄₀ и LLC со стандартным размером опухоли (опухолевый узел ≥ 1 см³), где селезеночные

нейтрофилы могли демонстрировать умеренную или высокую экспрессию маркера адгезии *Icam1* (на уровне мРНК), повышенную экспрессию PD-L1 и иммуносупрессивных маркеров (мРНК *Il10* для LLC и мРНК *Ccl17* для RLS₄₀).

Иммуногенность опухоли определяется её способностью вызывать адаптивный иммунный ответ. Низкая иммуногенность способствует росту опухоли и распространению метастазов, способствуя обходу иммунное распознавание [369]. Ключевым фактором иммуногенности является наличие опухоль-ассоциированных антигенов (ТАА) на поверхности опухолевых клеток. Эти антигены могут быть представлены на молекулах МНС I и распознаваться CD8⁺ цитотоксическими Т-клетками, которые, в свою очередь, инициируют апоптоз и остановку клеточного цикла опухолевых клеток, а также стимулируют высвобождение противоопухолевых медиаторов, таких как IFN-γ и TNF-α [370]. Меланома B16 известна своей низкой (или «отсутствующей») иммуногенностью, что можно объяснить низким уровнем МНС I на клетках B16 [363]. Низкая иммуногенность B16 может объяснить наблюдаемые результаты относительно фенотипа нейтрофилов селезенки.

Таким образом, фенотип нейтрофилов в селезенке зависит от стадии и типа опухоли: при стабильной опухолевой прогрессии (LLC) нейтрофилы склонны приобретать проопухолевый фенотип, способствующий уклонению от иммунного надзора; при опухолях характеризующихся низкой или практически отсутствующей иммуногенностью (B16) изменение фенотипа нейтрофилов не наблюдается; при опухолях, зависимых от ответа иммунной системы (RLS₄₀) фенотип нейтрофилов соотносится с агрессивностью опухоли: при прогрессирующем росте проявляются признаки нейтрофилов иммуносупрессивного фенотипа, тогда как а при удачной борьбе иммунной системы с опухолью (RLS₄₀^{Low}) возможна активация противоопухолевых иммунных механизмов, отражающаяся на фенотипе нейтрофилов.

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

3.4.1. Опухолевые модели и схема лечения

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 [42,43,52,44–51].

Далее оценивали иммунный статус нейтрофилов селезенки после терапии ДНКазой I. Клетки RLS₄₀ имплантировали в/м (10^6 кл., 0.1 мл) мышам линии СВА, клетки В16 имплантировали п/к (10^5 кл., 0.1 мл) мышам линии С57Вl. 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 16, А.

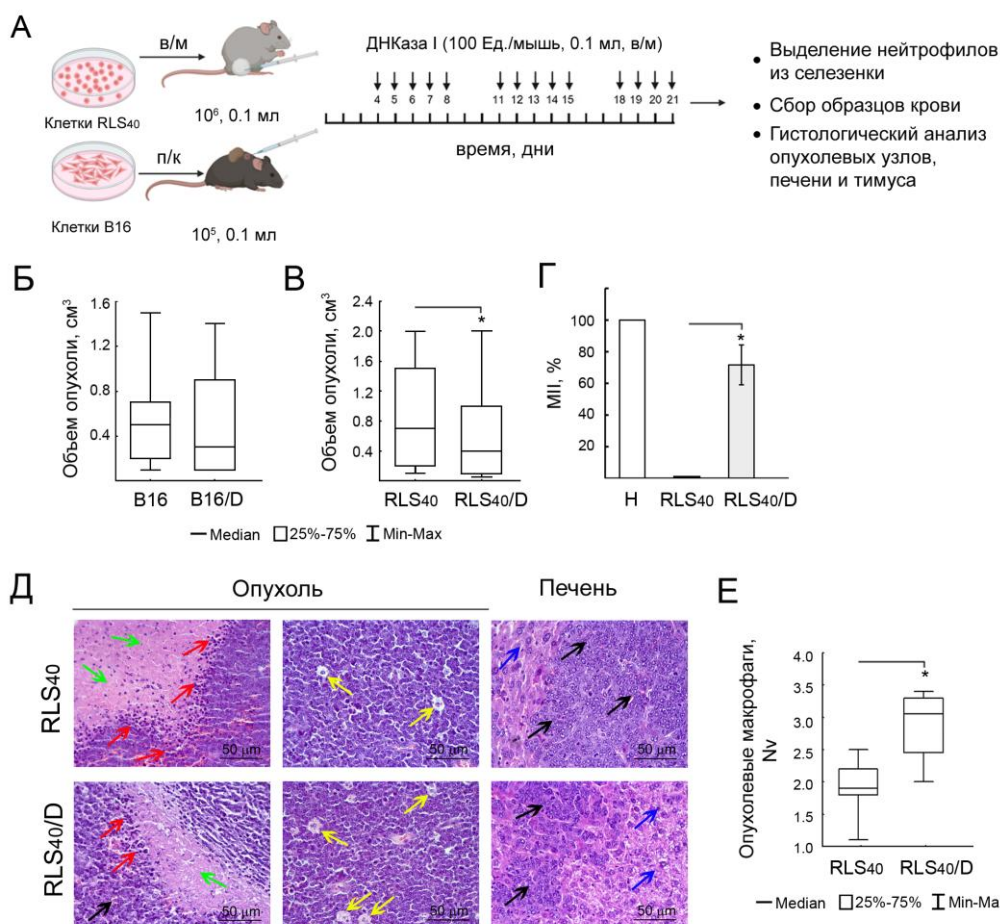


Рисунок 16. Влияние ДНКазы I на рост опухолей RLS₄₀ и В16 и развитие метастазов. **А.** Схема эксперимента. **Б** и **В.** Объем опухолей у мышей с В16 и RLS₄₀ соответственно. Данные представлены в виде медианы. Данные были статистически проанализированы с использованием t теста. * p < 0.05. **Г.** Метастазы в печени мышей с RLS₄₀. МII (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 21-й день после введения опухоли мышей из группы RLS₄₀ делили на подгруппы в зависимости от размера опухолевого узла: RLS₄₀^{High} – узел ≥ 1 см³, RLS₄₀^{Med} – узел от 0.1 до 1 см³, RLS₄₀^{Low} – узел ≤ 0.1 см³. В подгруппах RLS₄₀^{High} и RLS₄₀^{Med} опухоли были пальпируемыми, тогда как в RLS₄₀^{Low} пальпируемых узлов не выявлялось. Аналогичный подход применялся к группе B16, которая была разделена на B16^{High} (опухоли ≥ 1 см³) и B16^{Low} (опухоли ≤ 0.1 см³). После эвтаназии мышей нейтрофилы селезёнки выделяли и анализировали с использованием методов проточной цитометрии и RT-qPCR.

3.4.2. Влияние ДНКазы I на рост опухолей и метастазов у мышей с RLS₄₀ и B16

На Рис. 16 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 B16, но при этом отмечено снижение медианного значения размера опухоли в два раза (Рис. 16, Б).

На модели RLS₄₀ был продемонстрирован эффективный противоопухолевый эффект ДНКазы I: было показано достоверное 2-кратное снижение объема опухолевых узлов (Рис. 16, 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. 16, Г). Гистологический анализ показал, что опухолевые узлы RLS₄₀ и метастазы в печени были представлены полиморфными лимфоидными клетками с некротическим распадом в центральных зонах опухолевых узлов и реактивной клеточной инфильтрацией на границе с неизменной опухолевой тканью, представленной преимущественно лимфоцитами и макрофагами (Рис. 16, Д). Морфометрическое исследование ткани опухолевых узлов контрольной группы показало наличие макрофагов за пределами зон деструкции опухолевой ткани в количестве 1.9 ± 0.2 на тестовую зону. Введение ДНКазы I привело к увеличению этого показателя в 1.5 раза по сравнению с контролем (Рис. 16, Д, Е).

3.4.3. Анализ концентрации вДНК сыворотки крови и соотношения митохондриальной и ядерной ДНК

Анализ содержания вДНК в сыворотке крови мышей с RLS₄₀ и B16 выявил сильную корреляцию между объёмом опухоли и концентрацией вДНК: в подгруппе RLS₄₀^{High} наблюдалось значительное увеличение концентрации вДНК – в 7.4 раза, а в подгруппах RLS₄₀^{Med} и RLS₄₀^{Low} – в 4 раза по сравнению со здоровыми мышами

(Таблица 13). В группах, получавших ДНКазу I, концентрация внДНК снизилась, но, как и ожидалось, более выраженный эффект наблюдался в подгруппах RLS₄₀^{Med}/D и RLS₄₀^{Low}/D. Следует отметить, что даже в этих подгруппах концентрация внДНК была вдвое выше, чем у здоровых мышей линии СВА (Таблица 13). В модели В16 при развитии опухоли концентрация внДНК увеличивалась в 3 и 2 раза у мышей В16^{High} и В16^{Low}, соответственно, по сравнению со здоровым контролем, а введение ДНКазы I не оказывало влияния на этот параметр, что согласуется с отсутствием достоверного подавления роста опухоли В16 под действием ДНКазы I (Рис. 16, Б).

Интересный результат был получен при исследовании динамики соотношения митохондриальной (мтДНК) и ядерной ДНК (ядДНК). У здоровых мышей внДНК содержит мтДНК, но её количество относительно невелико. Развитие опухолей RLS₄₀ и В16 сопровождается 10-кратным увеличением соотношения мтДНК/ядДНК (Таблица 13).

Таблица 13. Концентрация внДНК в сыворотке крови и соотношение мтДНК/нукДНК.

	Концентрация внДНК, нг/мл	Соотношение мтДНК/ядДНК*
RLS₄₀		
Здоровые мыши СВА	420 ± 120	0.1 ± 0.2
RLS ₄₀ ^{High}	3100 ± 745 ^{##}	1.0 ± 0.1 ^{##}
RLS ₄₀ ^{Med}	1711 ± 480 [#]	1.1 ± 0.1 ^{##}
RLS ₄₀ ^{Low}	1558 ± 668 ^{#,§}	1.7 ± 0.1 ^{##,§}
RLS ₄₀ ^{High} /D	2033 ± 947 ^{##}	1.7 ± 0.1 ^{##}
RLS ₄₀ ^{Med} /D	822 ± 39 ^{§,†}	2.1 ± 0.1 ^{##}
RLS ₄₀ ^{Low} /D	722 ± 394 ^{§,†}	3.6 ± 0.2 ^{##,§,†}
В16		
Здоровые мыши С57В1	410 ± 120	0.1 ± 0.2
В16 ^{High}	1320 ± 708 [#]	1.0 ± 0.1 ^{##}
В16 ^{Low}	806 ± 224	1.2 ± 0.2 ^{##}
В16 ^{High} /D	1577 ± 819 [#]	1.7 ± 0.3 ^{##}
В16 ^{Low} /D	872 ± 433	0.8 ± 0.07 ^{##}

* Соотношение мтДНК/ядДНК рассчитывали, как относительные уровни митохондриального гена *Nd3* к ядерному гену *Actb* в внДНК (данные qPCR)

– статистические различия по сравнению со здоровым контролем;

§ – Различия между группами (RLS₄₀^{Low} vs RLS₄₀^{High}) или (В16^{Low} vs В16^{High});

Ψ – Различия между группами (RLS₄₀^{Low} vs RLS₄₀^{Med});

§ – Различия между группами (RLS₄₀^{Med} vs RLS₄₀^{High});

† – Различия между одноименными группами, получавшими физраствор или ДНКазу I;

одинарный символ $p \leq 0.05$; двойной символ $p \leq 0.01$. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

Интересно, что как спонтанное (подгруппа RLS₄₀^{Low}), так и опосредованное ДНКазой I снижение размера опухоли (подгруппа RLS₄₀^{Low}/D) сопровождаются

увеличением соотношения мтДНК/яДНК, причём наибольшее значение наблюдалось в подгруппе RLS₄₀^{Low}/D. В случае модели B16 такое же увеличение соотношения мтДНК/яДНК наблюдалось при развитии опухоли, однако, после введения ДНКазы I наблюдалось лишь незначительное колебание этого соотношения (Таблица 13).

3.4.4. Изменения в иммунокомпетентных органах под влиянием ДНКазы I

Для выявления возможного системного действия ДНКазы I у мышей с RLS₄₀ были проанализированы тимус, центральный орган иммуногенеза, изменения в котором отражают иммуномодулирующее действие противоопухолевых препаратов, и образцы крови. Гистологически тимус мышей был представлен корковым и мозговым веществом, соотношение которых различалось у здоровых мышей и мышей с RLS₄₀ (Рис. 17, А).

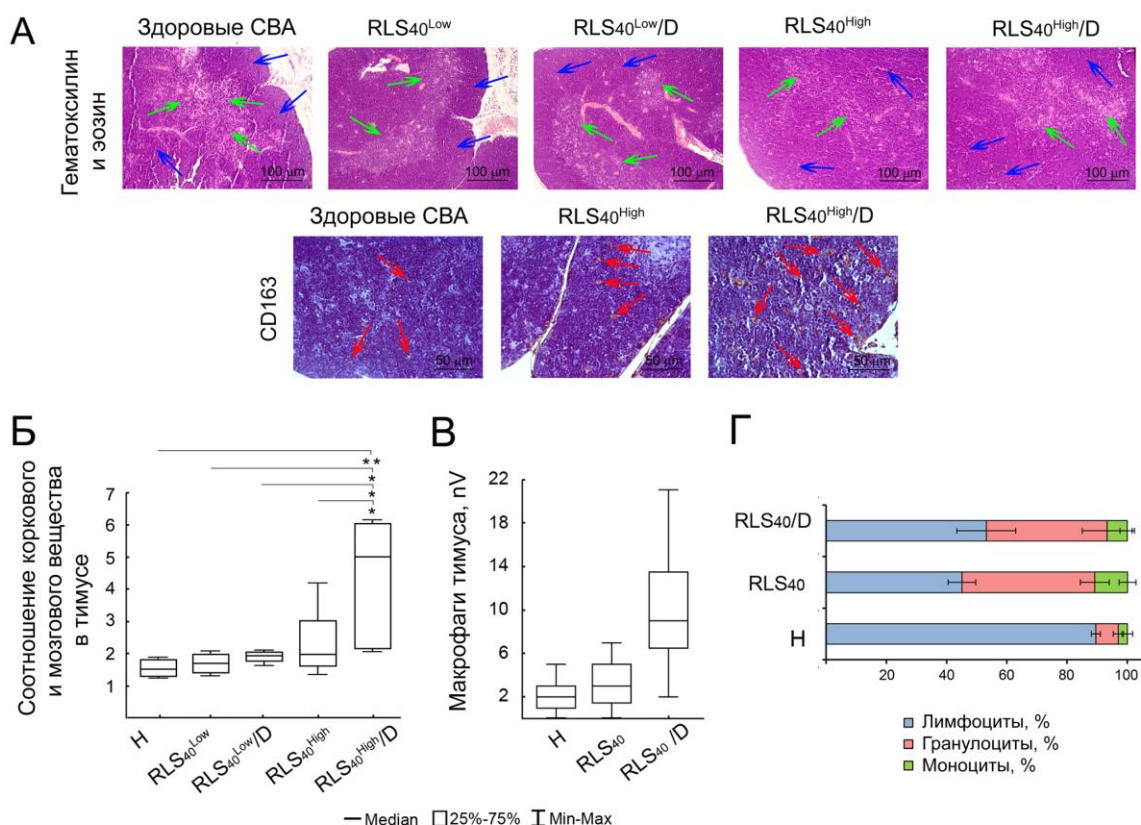


Рисунок 17. Влияние ДНКазы I на иммунные клетки в тимусе и периферической крови мышей с RLS₄₀. **А.** Типичные гистологические изображения тимуса здоровых мышей CBA и мышей с RLS₄₀, получавших инъекции физраствора и ДНКазы I. Окрашивание гематоксилином и эозином (верхняя панель) и иммуногистохимическое окрашивание первичными антителами к CD163 (нижняя панель). Синие стрелки – корковое вещество тимуса, зеленые стрелки – мозговое вещество тимуса, красные стрелки – макрофаги тимуса CD163⁺. **Б.** Соотношение коркового и мозгового вещества тимуса у здоровых мышей CBA и в подгруппах RLS₄₀ и RLS₄₀/D. **В.** Численная плотность макрофагов тимуса CD163⁺. **Г.** Доля (%) иммунных клеток в периферической крови здоровых мышей CBA и в подгруппах RLS₄₀ и RLS₄₀/D. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. * p < 0.05, ** p < 0.01.

У здоровых животных площадь коркового вещества тимуса составила $59.8 \pm 4.9\%$, а соотношение коркового к мозговому веществу тимуса в этой группе – 1.5 ± 0.3 (Рис. 17, А, Б). Рост опухоли в контрольных подгруппах RLS_{40}^{Low} и RLS_{40}^{High} привел к увеличению площади коркового вещества тимуса до $62.3 \pm 4.4\%$ и $65.2 \pm 8.1\%$, соответственно. Таким образом, соотношение коркового к мозговому веществу для этих групп увеличилось до 1.6 и 1.9, соответственно, что отражает активацию иммунной системы при прогрессировании опухоли (Рис. 17, А, Б). В подгруппе RLS_{40}^{High}/D было обнаружено увеличение площади коркового вещества тимуса до $83.3 \pm 8.4\%$, соотношение коркового к мозговому веществу составило 4.9. При этом в подгруппе RLS_{40}^{Low}/D увеличение было статистически не достоверным. Морфометрический анализ $CD163^{+}$ макрофагов тимуса выявил увеличение этого показателя в 4.5 и 3.0 раза после введения ДНКазы I по сравнению со здоровыми мышами и мышами с опухолью без лечения (9.0 vs 2.0 и 3.0 , соответственно, Рис. 17, В), что свидетельствует о стимуляции иммунной системы не только под действием роста опухоли, но и под действием ДНКазы I (Рис. 17, А, В).

При анализе периферической крови мышей подгрупп RLS_{40} и RLS_{40}/D было отмечено увеличение доли гранулоцитов в 5.9 и 5.3 раза, а также увеличение доли моноцитов в 3.6 и 2.7 раза по сравнению со здоровыми мышами СВА, что отражает реакцию иммунной системы на развитие опухоли (Рис. 17, Г).

3.4.5. Влияние ДНКазы I на фенотип нейтрофилов селезенки мышей с RLS_{40}

Для характеристики фенотипа нейтрофилов селезенки мышей с RLS_{40} и B16 были исследованы белковые маркеры и уровни мРНК генов, характеризующих проопухолевый или противоопухолевый фенотип нейтрофилов, ранее использованные в нашей работе. Данные проточной цитометрии и RT-qPCR для нейтрофилов мышей с RLS_{40} представлены на Рис. 18.

На модели RLS_{40} наиболее интересным наблюдением стало изменение экспрессии PD-L1 в зависимости от объема опухоли, наблюдаемое как на уровне белка, так и на уровне мРНК, которое коррелировало с ответом на введение ДНКазы (Рис. 18, А и Д). В контрольных подгруппах увеличение уровня мРНК *Pd-l1* отрицательно коррелировало с объемом опухоли: уровень мРНК *Pd-l1* в подгруппе RLS_{40}^{High} был самым низким (11.4 ± 1.9), а наибольшее увеличение экспрессии *Pd-l1* было выявлено в подгруппах RLS_{40}^{Med} и RLS_{40}^{Low} (23.7 ± 1.2 и 25.0 ± 4.3 , соответственно). Введение ДНКазы I привело к увеличению уровня мРНК *Cd274 (Pd-l1)*, 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. 18, 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 RLS₄₀^{Low}/D и RLS₄₀^{Med}/D по сравнению с соответствующей контрольной группой (RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med}); однако в подгруппах RLS₄₀^{High}/D и RLS₄₀^{High} различий не было (Рис. 18, А).

Аналогичная тенденция наблюдалась и для популяции FAS⁺ нейтрофилов, где наблюдалось повышение процента нейтрофилов FAS⁺ только в контрольной группе RLS₄₀^{Low}: 20.6 ± 1.9% в подгруппе RLS₄₀^{Low}, 1.4 ± 0.1 и 2.8 ± 0.3 в подгруппах RLS₄₀^{Med} и RLS₄₀^{High}, соответственно (Рис. 18, А). Введение ДНКазы I, при снижении размера опухоли, привело к увеличению популяции FAS⁺ до 25.8 ± 8.9% в подгруппе RLS₄₀^{Low}/D и до 5.6 ± 1.5% в подгруппе RLS₄₀^{Med}/D, а в подгруппе RLS₄₀^{High}/D изменений не было. Однако, уровень мРНК *Fas* незначительно менялся во всех подгруппах, как контрольных, так и экспериментальных, по сравнению с нейтрофилами селезенки здоровых животных (Рис. 18, Д), что может быть связано с коротким временем жизни этой мРНК. Уровни других белковых маркеров согласно данным проточной цитометрии не менялись при развитии опухоли и лечении.

По данным RT-qPCR наиболее выраженные изменения уровня мРНК наблюдались для генов *Icam1*, *Ern1*, *Vegfa*, *Ccl17*, *Il10* и *Stat3*. Однако в большинстве случаев эти изменения уровня мРНК не коррелировали с объемом опухоли и/или введением ДНКазы I (Рис. 18, Б – Д, Таблица S12). В подгруппе RLS₄₀^{Low} наблюдалось повышение уровня мРНК *Icam1* в 2.6 раза по сравнению с нейтрофилами селезенки здоровых мышей (9.9 ± 2.1 vs 3.8 ± 2.5%), тогда как в подгруппах RLS₄₀^{Med} и RLS₄₀^{High} значимых изменений уровня мРНК *Icam1* не наблюдалось (Рис. 18, В). При введении ДНКазы I уровень мРНК *Icam1* повышался в подгруппах RLS₄₀^{Low}/D и RLS₄₀^{Med}/D (15.2 ± 2.8 и 48.1 ± 0.6, соответственно), тогда как в подгруппе RLS₄₀^{High}/D изменений обнаружено не было (Рис. 18, В, Таблица S12).

Среди противовоспалительных проопухолевых маркеров повышенный уровень мРНК *Ccl17* наблюдался только в подгруппе RLS₄₀^{High}, в то время как в подгруппах, получавших ДНКазу I, уровень мРНК *Ccl17* находился на уровне, наблюдаемом у здоровых животных (Рис. 18, В). Аналогичным образом, в подгруппах RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med} уровень мРНК *Il10* был повышен в 4 раза по сравнению с нейтрофилами селезенки здоровых животных (4.1 ± 0.9 и 4.2 ± 0.01, соответственно), введение ДНКазы снижало уровень мРНК *Il10* до уровня здоровых животных (Рис. 18, В, Таблица S12) тогда как в подгруппах RLS₄₀^{High} и RLS₄₀^{High}/D был на уровне здорового контроля (Рис. 18, В). Уровни

мРНК *Tnfa* были статически незначимо повышены до 2–3 раз в подгруппах RLS₄₀^{Low}, RLS₄₀^{Low}/D и RLS₄₀^{Med}/D вне зависимости от терапии ДНКазой I (Рис. 18, В, Таблица S12).

Уровень мРНК *Vegfa* незначительно колебался во всех контрольных и экспериментальных подгруппах, за исключением подгруппы RLS₄₀^{Med}/D, в которой наблюдалось повышение уровня мРНК по сравнению с нейтрофилами КМ здоровых мышей (3.3 ± 0.1) (Рис. 18, Б, Таблица S12). Уровень мРНК *Vegfr1*, рецептора VEGF, также повышался в подгруппе RLS₄₀^{Med}/D (12.9 ± 5.0).

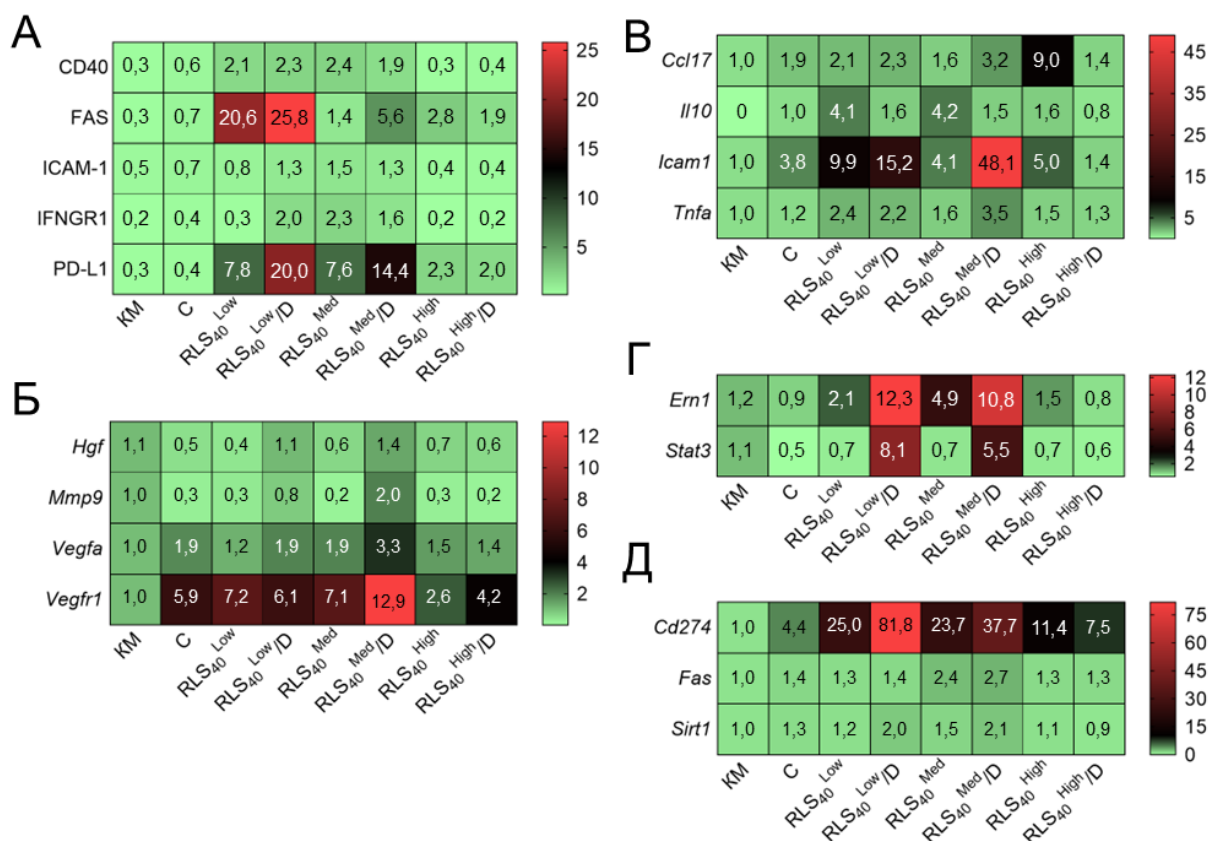


Рисунок 18. Фенотип нейтрофилов мышей с RLS₄₀, получавших инъекции физраствора и ДНКазы I. **А.** Тепловая карта данных проточной цитометрии. Результаты представлены как % от популяции нейтрофилов Ly6G⁺. Относительный уровень мРНК проангиогенных и регенеративных маркеров (**Б**), воспалительных маркеров (**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: КМ – нейтрофилы костного мозга, С – нейтрофилы селезенки. 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. Результаты представлены как Mean. Тепловая карта с градиентом окраски от зеленого к красному, где зеленый цвет соответствует низким значениям, а красный – высоким значениям.

Среди генов-участников сигнальных путей уровень мРНК *Ern1* был статически незначимо повышен как в RLS₄₀^{Low}/D по сравнению с подгруппой RLS₄₀^{Low} (12.3 ± 6.8 vs 2.1 ± 0.8 , $C=0.9 \pm 0.2$), так и в RLS₄₀^{Med}/D по сравнению с подгруппой RLS₄₀^{Med} (10.8 ± 5.9 vs 4.9 ± 1.8 , $C=0.9 \pm 0.2$), и незначительно колебался в подгруппах RLS₄₀^{High} и RLS₄₀^{High}/D (1.5 ± 0.2 vs 0.8 ± 0.4 , $C=0.9 \pm 0.2$). Уровень мРНК *Stat3* был статически незначимо повышен в подгруппах RLS₄₀^{Low}/D и RLS₄₀^{Med}/D (8.1 ± 4.4 и 5.5 ± 3.0 , $C=0.5 \pm 0.1$) (Рис. 18, Г, Таблица S12).

3.4.6. Влияние ДНКазы I на фенотип нейтрофилов селезенки мышей с B16

По данным проточной цитометрии на модели B16 наблюдали минимальные изменения (2 – 7%) популяции нейтрофилов, экспрессирующих исследуемые маркеры (CD40, FAS, ICAM-1, IFN γ R1 и PD-L1) в подгруппах B16^{Low} и B16^{Low}/D, независимо от введения ДНКазы I (Рис. 19, А).

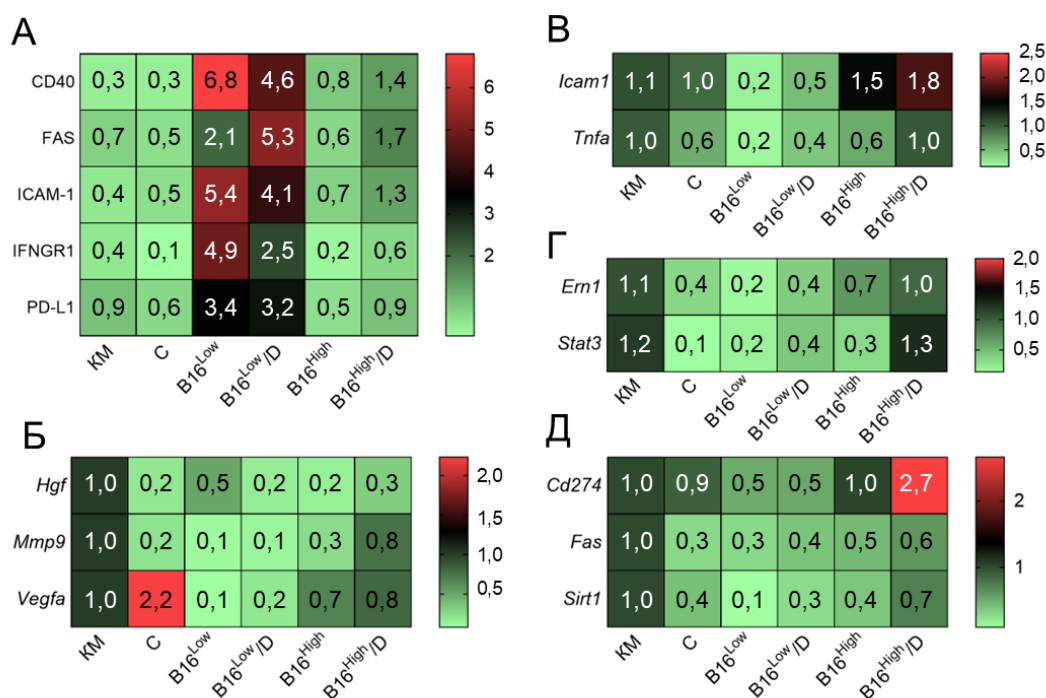


Рисунок 19. Фенотип нейтрофилов мышей с B16, получавших инъекции физраствора и ДНКазы I. **А.** Тепловая карта данных проточной цитометрии. Результаты представлены как % от популяции нейтрофилов Ly6G⁺. Относительный уровень мРНК проангиогенных и регенеративных маркеров (**Б**), воспалительных маркеров (**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. 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. Результаты представлены как Mean. Тепловая карта с градиентом окраски от зеленого к красному, где зеленый цвет соответствует низким значениям, а красный – высоким значениям.

Данные RT-qPCR показали снижение экспрессии большинства исследуемых генов во всех подгруппах B16 по сравнению с нейтрофилами КМ, за исключением *Icam1* и *Pd-l1* (Рис. 19, Б – Д, Таблица S10). Было выявлено некоторое повышение уровня мРНК *Icam1* в подгруппах B16^{High} и B16^{High}/D (1.5 ± 0.6 и 1.8 ± 0.5 , $C=1.0 \pm 0.5$) и повышение уровня мРНК *Pd-l1* в B16^{High}/D по сравнению с подгруппой B16^{High} (2.7 ± 1.2 против 1.0 ± 0.03), однако, изменения статистически не достоверны.

3.4.7. Обсуждение и заключение

Для подтверждения полученных данных о накоплении нейтрофилов с различными фенотипами в модели RLS₄₀, важно было оценить влияние терапии, эффективно подавляющей рост опухоли и метастазирование, на фенотип нейтрофилов у мышей с опухолевым процессом. Ранее противоопухолевое и антиметастатическое действие бычьей панкреатической ДНКазы I было продемонстрировано на различных моделях опухолей мыши [42–47]. Аналогичные эффекты были подтверждены и в других исследованиях [48–52], что делает применение ДНКазы I перспективным направлением в терапии рака [371–373]. Противоопухолевый механизм действия ДНКазы I может быть обусловлен разрушением онко-ассоциированных последовательностей в циркулирующей в кровотоке вДНК или поддерживающих опухолевую прогрессию избыточных NET [47]. Однако, системное действие ДНКазы может быть связано с её иммуномодулирующей способностью, в частности, влиянием на фенотип нейтрофилов, что ведёт к восстановлению противоопухолевого иммунитета [43,44,374]. Кроме того, в наших исследованиях на модели LPS-индуцированного фиброза легких был выявлен антифибротический эффект ДНКазы I, который реализовывался в том числе и за счет изменения фенотипа нейтрофилов селезенки [375].

На слабо иммуногенной модели меланомы B16 введение ДНКазы I не привело к достоверному снижению роста опухоли и не вызвало существенных изменений фенотипа нейтрофилов селезенки. Однако, ранее ДНКазы I показала высокую антиметастатическую активность именно на модели метастатической меланомы B16 без первичного опухолевого узла [42].

Различия в эффективности ДНКазы I можно в значительной степени объяснить фундаментальными биологическими различиями между моделями подкожно и внутривенно имплантируемых опухолей. Модель подкожно-вводимой B16 подразумевает локализованный рост опухоли, обычно с образованием единого опухолевого узла, ограниченного местом инъекции. Эта модель в первую очередь отражает раннее развитие опухоли и локальные иммунные взаимодействия в относительно ограниченной

микросреде. Напротив, модель метастатической меланомы B16, инициируемой посредством внутривенной имплантации, воспроизводит сложные процессы инвазии опухолевых клеток, циркуляции, экстравазации и колонизации дистальных органов, в частности, легких. Эти метастатические опухоли связаны с более динамичной и иммуносупрессивной микросредой, характеризующейся обширным образованием NET и повышенными уровнями циркулирующей внДНК. Механизм действия ДНКазы I включает деградацию внДНК и NET, которые играют важную роль в содействии метастазированию опухолей и уклонению от иммунного надзора. Это может объяснить ограниченное анти-опухолевое действие ДНКазы I и её влияние на фенотипы нейтрофилов, наблюдаемые здесь.

Наши результаты демонстрируют различный ответ на ДНКазу I в группах RLS₄₀^{Low}, RLS₄₀^{Med} и RLS₄₀^{High}, подчеркивая сложность модуляции микроокружения опухоли при деградации внДНК. Наиболее выраженный эффект ДНКазы I наблюдался в группе RLS₄₀^{Low}, где доля нейтрофилов PD-L1⁺ и FAS⁺ значительно увеличилась. Это свидетельствует о том, что ДНКазы I, с одной стороны, может усиливать иммунорегуляторные функции нейтрофилов на ранних стадиях (или для менее агрессивных опухолей), а с другой – усиливать взаимодействия между нейтрофилами и опухолевыми клетками RLS₄₀, которые имеют лимфоидное происхождение и экспрессируют PD-1 на своей поверхности.

В то время как экспрессия *Mmp9* и *Vegfa* оставалась стабильной во всех группах, экспрессия *Vegfr1* была умеренно повышена – до 2 раз в группе RLS₄₀^{Med} после введения ДНКазой I. Такой эффект потенциально способствует ремоделированию сосудов или привлечению нейтрофилов в опухолевое микроокружение в промежуточных стадиях опухолевой прогрессии [134].

Согласно данным литературы, TAN привлекают T-регуляторные клетки в опухолевое микроокружение посредством выделения хемокина CCL17 [130,131]. Наши данные показали снижение экспрессии проопухолевого, противовоспалительного гена *Ccl17* в нейтрофилах группы RLS₄₀^{High} после лечения ДНКазой I. Это свидетельствует о том, что ДНКазы I может ослаблять иммуносупрессивную сигнализацию в запущенных опухолях, потенциально восстанавливая противоопухолевый иммунитет. Аналогичным образом, экспрессия *Il10*, повышенная в группах RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med}, нормализовалась после введения ДНКазы I, что указывает на восстановление баланса воспалительной среды. Эти результаты подчеркивают способность ДНКазы I влиять на воспалительную среду, способствующую развитию опухоли, что имеет решающее значение для прогрессирования опухоли и уклонения от иммунного ответа. Данные выводы

подтверждаются недавними доказательствами, связывающими активность ДНКазы с усилением противоопухолевых иммунных реакций, включая улучшение функционирования цитотоксических Т-клеток и активности дендритных клеток [374,376].

Умеренное повышение экспрессии генов *Ern1* и *Stat3* в группах RLS₄₀^{Low} и RLS₄₀^{Med} после введения ДНКазы I свидетельствует об активации стресса эндоплазматического ретикулума и сигнальных путей STAT3. Учитывая роль STAT3 в нейтрофилах, способствующую выживанию опухолей и иммунной модуляции [377,378], повышенная экспрессия этого гена может отражать компенсаторный ответ организма или сложное взаимодействие между эффектами лечения ДНКазой I и сигнализацией опухолевых клеток.

Механизм действия ДНКазы может быть связан как с разрушением онкогенных ДНК и NET [47], так и с иммуномодуляцией и восстановлением противоопухолевого иммунитета [43,44,374]. Более того, деградация NET может влиять на фенотип нейтрофилов, так как NET могут по механизму положительной обратной связи вызывать нетоза у других нейтрофилов [379,380]. Кроме того, в наших исследованиях на модели фиброза лёгких, был выявлен антифибротический эффект ДНКазы I, который также отражался на фенотипе нейтрофилов селезёнки [375].

Предполагается также, что триггерным событием может быть изменение соотношения митохондриальной и ядерной ДНК в крови под действием ДНКазы I, со значительным снижением относительного уровня ядерной ДНК и повышением уровня митохондриальной ДНК. Аналогичные результаты были ранее получены при анализе вкДНК из бронхо-альвеолярной жидкости мышей с острым легочным фиброзом, получавших интраназально ДНКазу I [375]. Интересно, что ДНКазы I вызвала изменение соотношения митохондриальной и ядерной вкДНК в крови только у мышей RLS₄₀, но у мышей B16 изменения были незначительными, что могло быть причиной или следствием последующих различных иммунных эффектов. Тем не менее, вероятно, что изменение соотношения митохондриальной и ядерной вкДНК может быть ключевым событием, вызывающим дополнительный приток макрофагов и изменение профиля нейтрофилов.

В целом, ДНКазы I оказывает многогранное воздействие на фенотип нейтрофилов и профиль экспрессии генов в модели RLS₄₀. При этом эффект от введения существенно зависел от стадии роста и агрессивности опухоли. Усиление экспрессии маркеров иммунных контрольных точек и ангиогенных рецепторов, наряду с модуляцией воспалительных генов, подчеркивает потенциал ДНКазы I в качестве адъювантной терапии, способной эффективно изменять микроокружение опухоли.

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

3.5.1. Изучение уровня нетоза нейтрофилов селезенки мышей с RLS_{40}

Для изучения способности нейтрофилов к образованию NET использовали нейтрофилы селезенки мышей с RLS_{40} получавших физраствор или ДНКазу I по схеме, описанной в разделе 3.4.1. Индукцию NET у нейтрофилов, выделенных из групп RLS_{40}^{Low} , RLS_{40}^{Low}/D , RLS_{40}^{High} и RLS_{40}^{High}/D , исследовали под действием химического активатора A23187. Репрезентативные изображения, полученные методом конфокальной флуоресцентной микроскопии, представлены на Рисунках 20 А и S4.

Из представленных данных видно, что нейтрофилы подгрупп RLS_{40}^{Low} и RLS_{40}^{High} , как наивные, так и стимулированные A23187, подвергаются нетозу, характеризующемуся образованием нитевидных или облакоподобных NET (панели DAPI и Merged, белые стрелки, Рис. 20, А, Рис. S4).

Уровень спонтанного нетоза у нейтрофилов здоровых мышей составил 28% (Рис. 20, Б). Уровень спонтанного образования NET был повышен в подгруппах RLS_{40}^{High} и RLS_{40}^{High}/D по сравнению с подгруппой RLS_{40}^{Low} : спонтанное образование NET составило 33% (диапазон 29–50%) в подгруппе RLS_{40}^{High} и 36% (диапазон 26–45%) в подгруппе RLS_{40}^{High}/D (Рис. 20, Б). Нейтрофилы из подгрупп RLS_{40}^{Low} и RLS_{40}^{Low}/D характеризовались наименьшим уровнем спонтанного нетоза, медианное значение которого составило 20% для обеих групп (диапазон 5–34% и 9–33%, соответственно) (Рис. 20, Б).

При стимуляции A23187 нейтрофилы во всех группах ответили на активацию и продемонстрировали более высокий уровень образования NET по сравнению со спонтанным нетозом (Рис. 20, В). Уровень стимулированного нетоза в нейтрофилах здоровых мышей и мышей подгрупп RLS_{40}^{Low} и RLS_{40}^{Low}/D был примерно одинаковым и составил 35% (Рис. 20, В). После стимуляции нейтрофилы мышей подгрупп RLS_{40}^{High} и RLS_{40}^{High}/D характеризовались более высоким уровнем образования NET по сравнению с другими группами: уровни нетоза составили 48% (диапазон 36–74%) и 46% (диапазон 14–64%) в подгруппах RLS_{40}^{High} и RLS_{40}^{High}/D , соответственно (Рис. 20, 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. 20, Б и В).

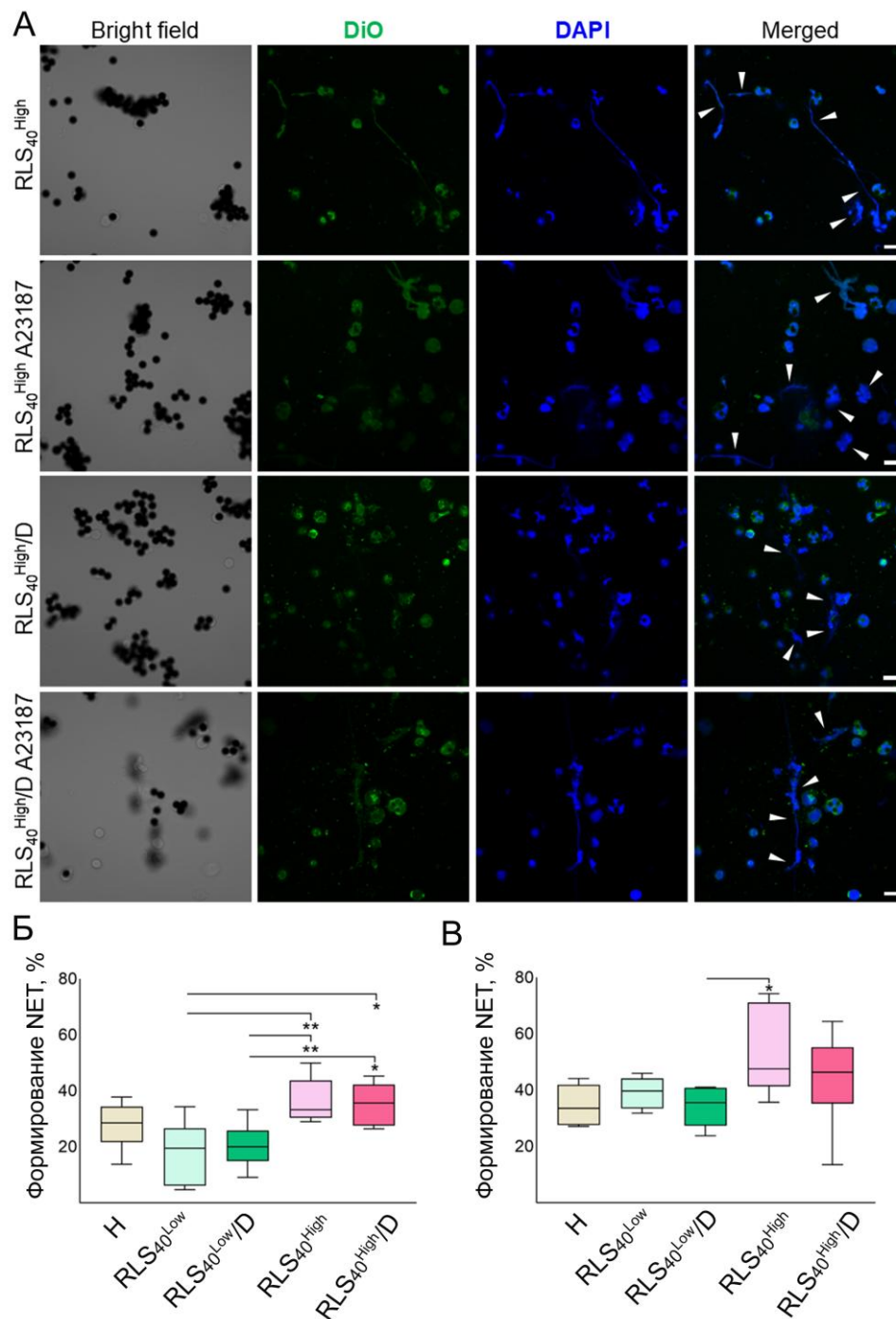


Рисунок 20. NET, образованные нейтрофилами селезенки мышей с RLS₄₀, получавших инъекции физраствора и ДНКазы I. **А.** Образование NET нейтрофилами подгрупп RLS₄₀^{High} и RLS₄₀^{High/D} в отсутствие и присутствии A23187. **Б.** Процент нейтрофилов, подвергшихся спонтанному нетозу. **В.** Процент нейтрофилов, 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. RLS₄₀^{Low} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS₄₀ с опухолевым узлом размером менее 0.1 см³, RLS₄₀^{High} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS₄₀ с опухолевым узлом размером более 1 см³. Группы RLS₄₀/D – мыши, получавшие ДНКазу I.

3.5.2. Обсуждение и заключение

Наши данные подтверждают, что нейтрофилы из мышей с большими опухолями (группа RLS₄₀^{High}) обладают повышенной способностью к образованию NET как спонтанно, так и после стимуляции A23187, что согласуется с литературными данными о степени нетоза при опухолевой прогрессии. NET способствуют развитию опухоли, стимулируя пролиферацию клеток, подавляя иммунный ответ и способствуя метастазированию [29,76,381]. В то же время нейтрофилы из группы RLS₄₀^{Low} с замедленным ростом опухоли, демонстрируют сниженный спонтанный нетоз, но сохраняют способность к индуцированному образованию NET, что может отражать более сбалансированные способности к иммунному ответу.

Тенденция к снижению образования NET из нейтрофилов, выделенных из мышечной опухолиносителей после терапии ДНКазой I, подтверждает восстановление противоопухолевого иммунного ответа. Согласно современным данным, ДНКаза I может гидролизовать не только ДНК, но и нуклеотиды, такие как АТФ и АДФ, которые являются мощными активаторами нейтрофилов и тромбоцитов [382]. Гидролиз АТФ и АДФ приводит к образованию аденозина – вещества, ингибирующего активацию нейтрофилов и подавляющего воспалительный ответ [382]. Таким образом, ДНКаза I может понижать уровень нейтрофильной активации не только через разрушение NET, но и через модуляцию сигналов, стимулирующих нетоз.

NET известны тем, что защищают опухолевые клетки от цитотоксических Т-лимфоцитов и мешают прямому контакту с опухолевыми клетками в ТМЕ и в кровообращении, что способствует росту опухоли и метастазированию [295,372]. Разрушение NET позволяет восстанавливать связи между клетками в ТМЕ. Помимо Т-клеток, важную роль в ТМЕ играет популяция макрофагов. Было показано, что взаимодействие между опухоль-ассоциированными нейтрофилами (TAN) и опухоль-ассоциированными макрофагами (TAM) имеет ключевое значение в некоторых онкологических заболеваниях [383]. Более того, установлено, что макрофаги участвуют в разрушении NET [384]. Клиренс NET макрофагами может влиять на их фенотип и функционирование. Разрушение NET ДНКазой тем самым может воздействовать на макрофаги. Это может объяснить наблюдаемое усиленное проникновение макрофагов в опухоль в результате введения ДНКазой (Рис. 16, Е).

В контексте опухолевой микросреды, где нейтрофилы активно образуют NET, способствующие прогрессированию опухоли и метастазированию, ингибирование образования NET или способности нейтрофилов к нетозу с помощью ДНКазы I может ослаблять проопухолевое воспаление и снижать агрессивность опухоли [40,385]. Это

подтверждается наблюдениями снижения нетоза у нейтрофилов из мышей, получавших лечение ДНКазой.

3.6. Получение нейтрофилов противоопухолевого фенотипа

3.6.1. Получение и характеристика нейтрофилов противоопухолевого фенотипа *in vitro*

Для поляризации нейтрофилов *in vitro* использовали нейтрофилы костного мозга здоровых мышей. Нейтрофилы выделяли с помощью отрицательной иммуномагнитной сорбции и подвергали поляризации с помощью смеси провоспалительных факторов LPS, IFN- γ и IFN- β (Рис. 21, А). Для поддержания жизнеспособности нейтрофилов в условиях *in vitro* в среду добавляли ингибитор апоптоза QVD-Qph, что позволяло предотвратить преждевременную гибель клеток и сохранить их функциональную активность на протяжении всего эксперимента. 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. 21, Б). Оказалось, что под действием коктейля стимуляторов наблюдается статистически значимое повышение экспрессии всех исследованных поверхностных маркеров противоопухолевого фенотипа нейтрофилов (N1). Около 80% поляризованных нейтрофилов экспрессировали FAS, PD-L1 и ICAM-1 на своей поверхности (Рис. 21, Б). Также наблюдалось умеренное повышение процента нейтрофилов экспрессирующих CD40 и IFN γ R1 (до 10%) (Рис. 21, Б).

3.6.2. Цитотоксичность нейтрофилов противоопухолевого фенотипа по отношению к клеткам меланомы B16

Поляризованные нейтрофилы были ко-культивированы с клетками меланомы B16 в соотношении 1 : 1, 1 : 3 и 1 : 20 (B16 : нейтрофилы) в течение 24 ч и далее анализ цитотоксичности нейтрофилов по отношению к опухолевым клеткам проводили с использованием МТТ-теста (Рис. 21, В). В качестве контроля использовали нейтрофилы группы N0 (без поляризации). Как видно из представленных данных нейтрофилы N0 не оказывали влияния на жизнеспособность опухолевых клеток при соотношении 1 : 1 и 1 : 3: при соотношении 1 : 1 жизнеспособность составила $95 \pm 3.4\%$; при 1 : 3 – $94 \pm 2.8\%$ (Рис. 21, 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. 21, 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. 21, В).

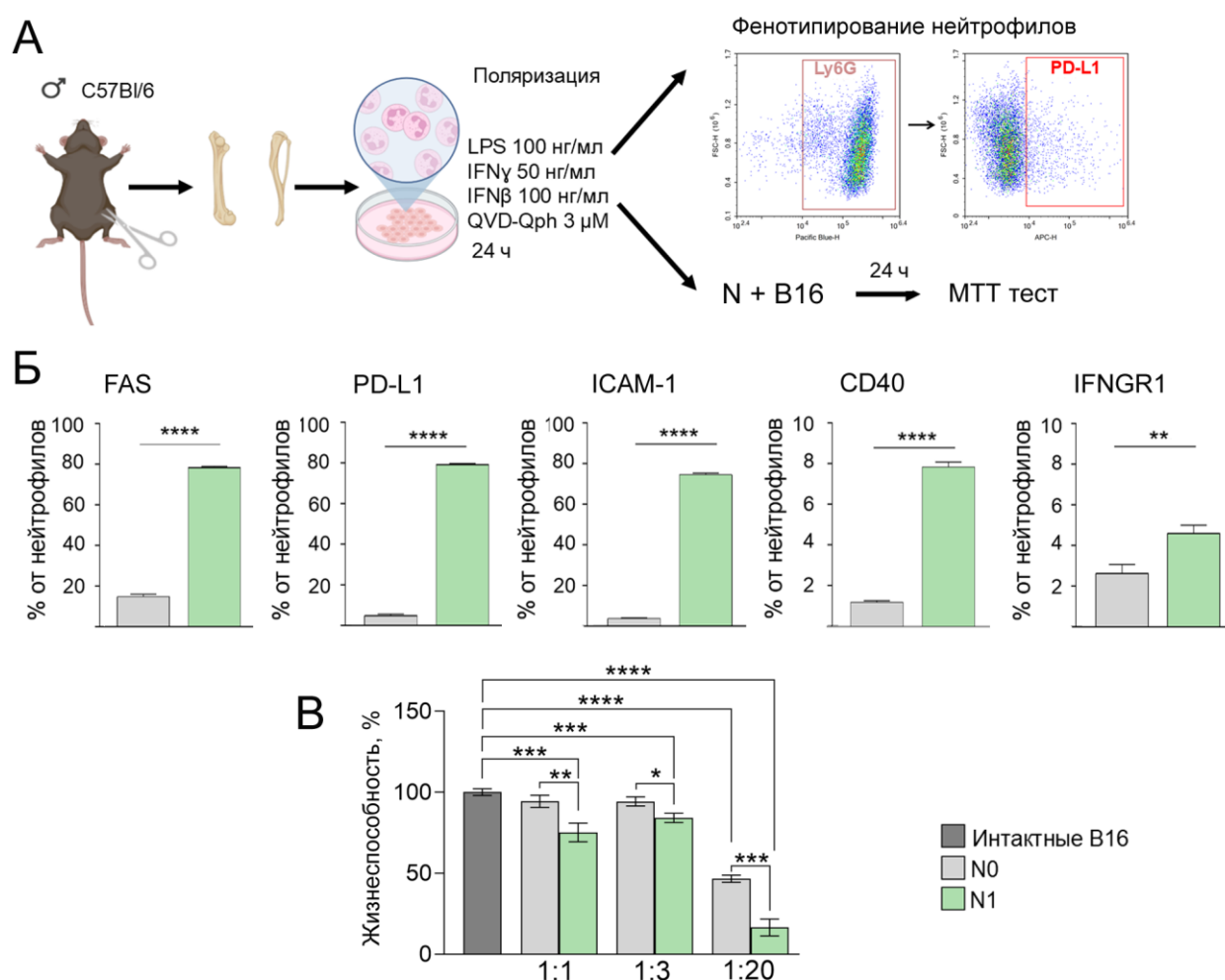


Рисунок 21. Получение и характеристика нейтрофилов с противоопухолевой активностью *in vitro*. **А.** Схема поляризации и ко-культивирования нейтрофилов со клетками B16. **Б.** Процент нейтрофилов, поляризованных *in vitro*, экспрессирующих на своей поверхности маркеры FAS, PD-L1, ICAM-1, CD40 и IFN γ R1. Результаты получены методом проточной цитометрии. **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. Статистический анализ выполнен с использованием t-теста критерия Стьюдента. * $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$; **** — $p < 0.0001$.

3.6.3. Обсуждение и заключение

В результате активации нейтрофилов под действием коктейля стимуляторов у нейтрофилов было выявлено статистически значимое повышение экспрессии поверхностных маркеров, характеризующих противоопухолевый фенотип. Такой профиль

свидетельствует о формировании нейтрофилов противоопухолевого фенотипа, которые способны эффективно взаимодействовать с опухолевыми клетками и другими элементами иммунной системы.

Высокий уровень экспрессии FAS (CD95) указывает на способность нейтрофилов индуцировать апоптоз опухолевых клеток через рецепторный путь FAS/FASL, что является важным механизмом противоопухолевого иммунитета [118–120].

PD-L1 несут как проопухолевые, так и противоопухолевые нейтрофилы [124]. Наши данные показали, что *in vivo* поляризация нейтрофилов в организме животных-опухоленосителей при терапии ДНКазой I сопровождается значительным повышением экспрессии PD-L1, что может отражать их переход в активированное состояние. Аналогичный эффект наблюдался и *in vitro* при стимуляции нейтрофилов провоспалительными цитокинами LPS, IFN- γ и IFN- β . Повышенная экспрессия PD-L1 на N1-нейтрофилах может усиливать их способность к прямому взаимодействию с опухолевыми клетками, индуцируя апоптоз через PD-1/PD-L1-зависимые механизмы.

Увеличение уровня ICAM-1 (CD54) отражает усиление адгезивных свойств нейтрофилов, что способствует их миграции и взаимодействию с эндотелиальными и иммунными клетками [386].

Полученные данные показали, что нейтрофилы группы N0 (неполяризованные) не влияли на жизнеспособность опухолевых клеток при соотношениях клеток 1 : 1 и 1 : 3, что свидетельствует о низкой цитотоксической активности этих клеток в нативном состоянии. Аналогичные результаты были отмечены в ряде исследований, где неполяризованные нейтрофилы мыши и человека демонстрировали минимальное влияние на рост опухолевых клеток [9,387]. Однако, только при высоком соотношении 1 : 20 нейтрофилы N0 начинают демонстрировать заметное снижение жизнеспособности опухолевых клеток. Высокое соотношение усиливает прямые клеточные взаимодействия, способствующие активации нейтрофилов и их цитотоксической функции. Тем не менее, при тех же условиях нейтрофилы N1 проявляют значительно более высокую цитотоксическую активность и эффективнее снижают жизнеспособность опухолевых клеток.

В то же время нейтрофилы, поляризованные в противоопухолевый фенотип N1, вызывали статистически значимое снижение жизнеспособности клеток меланомы, что свидетельствует об их цитотоксическом потенциале. Этот эффект наблюдался при разных соотношениях клеток, что подтверждает эффективность N1-нейтрофилов в подавлении роста опухолевых клеток *in vitro*. Однако полученные данные согласуются с результатами предыдущих исследований, в которых N1-нейтрофилы демонстрировали способность эффективно уничтожать опухолевые клетки [9,174]. В работах группы Фридлендера было

показано, что при инкубации опухолевых клеток с нейтрофилами в соотношении 1 : 10 (опухолевые клетки : нейтрофилы) жизнеспособность опухолевых клеток снижалась примерно до 90% [174], При увеличении соотношения до 1 : 20 наблюдалось более выраженное снижение жизнеспособности до 50% [9,174]. Следует отметить, что в этих исследованиях использовались TAN, поляризованные *in vivo* в фенотип N1 посредством ингибирования TGF- β у мышей с опухолями.

Таким образом, по сравнению с опубликованными данными, полученные нами нейтрофилы N1 демонстрируют сопоставимую противоопухолевую активность и могут служить перспективной моделью для дальнейшего изучения механизмов противоопухолевой функции нейтрофилов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование значительно расширяет понимание функциональной гетерогенности нейтрофилов и их роли в опухолевом микроокружении, что является актуальной темой современной онкоиммунологии.

С помощью метода иммуномагнитной положительной селекции была выделена чистая фракция нейтрофилов из селезёнки мышей. Данный подход позволил выделять нейтрофилы с сохранением их физиологической активности, что является критически важным для последующих функциональных и молекулярных исследований.

Впервые в рамках данного исследования установлено, что гены *Tbp* и *Hprt1* демонстрируют стабильную и конститутивную экспрессию в мышинных нейтрофилах, независимо от состояния иммунной активации.

На моделях опухолей LLC и RLS₄₀ выявлена значительная гетерогенность популяций нейтрофилов, отражающая их двойственную роль в онкологии. В модели LLC наблюдалось повышение экспрессии *Il10* и *Cd274* (PD-L1), что соответствует фенотипу, способствующему прогрессированию опухоли и подавлению противоопухолевого иммунитета. В модели RLS₄₀ профиль TAN коррелировал с размером опухоли: проопухолевые нейтрофилы преобладали у животных с крупными опухолями, тогда как противоопухолевые – у мышей с замедленным ростом новообразований. Эти данные подтверждают концепцию, согласно которой нейтрофилы могут переключаться между про- и противоопухолевыми фенотипами в зависимости от микроокружения и стадии опухолевого процесса, что согласуется с современными представлениями о пластичности нейтрофилов в опухолевом микроокружении.

Особое внимание уделялось влиянию терапии ДНКазой I на модуляцию нейтрофилов селезенки экспериментальных животных; на модели RLS₄₀ ДНКазы I проявляла иммуностимулирующий эффект, снижая в нейтрофилах уровень мРНК иммуносупрессивных маркеров (*Il10*, *Ccl17*) и повышая экспрессию противоопухолевого маркера FAS и иммунного регулятора PD-L1. Это свидетельствует о способности ДНКазы I модулировать функциональное состояние нейтрофилов, снижая их иммуносупрессивный потенциал и способствуя усилению противоопухолевого иммунитета. Однако, на модели B16 терапия ДНКазой I не оказала значимого влияния на рост опухоли и профиль нейтрофилов, что подчёркивает необходимость учитывать особенности конкретной опухолевой модели и её микроокружения при разработке терапевтических стратегий.

Кроме того, нейтрофилы у мышей с большими опухолями демонстрировали повышенную склонность к спонтанному нетозу и его активации в ответ на стимуляторы, что может способствовать поддержанию роста опухолевых клеток. Введение ДНКазы I снижало способность нейтрофилов к образованию NET, что свидетельствует о потенциале данного фермента как эффективного средства для таргетирования NET и нетоз-зависимых механизмов в опухолевой патологии. Эти результаты открывают перспективы использования ДНКазы I в качестве компонента комплексной онкотерапии, направленной на подавление проопухолевых функций нейтрофилов и улучшение иммунного контроля над опухолевым ростом.

Таким образом, результаты исследования подчёркивают сложную и двойственную роль нейтрофилов в опухолевом процессе, демонстрируя их потенциал как мишеней для терапевтического вмешательства. Перспективы дальнейших исследований связаны с 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Montaldo E. et al. Cellular and transcriptional dynamics of human neutrophils at steady state and upon stress // *Nat. Immunol.* 2022. Vol. 23, № 10. P. 1470–1483.
2. Ballesteros I. et al. Co-option of Neutrophil Fates by Tissue Environments // *Cell.* 2020. Vol. 183, № 5. P. 1282–1297.
3. Silvestre-Roig C. et al. Neutrophil Diversity in Health and Disease // *Trends Immunol.* 2019. Vol. 40, № 7. P. 565–583.
4. Bonaventura A. et al. Novel findings in neutrophil biology and their impact on cardiovascular disease // *Cardiovasc. Res.* 2019. Vol. 115, № 8. P. 1266–1285.
5. Blood C.H., Zetter B.R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis // *Biochim Biophys Acta.* 1990. Vol. 1032, № 1. P. 89–118.
6. Welch D.R. et al. Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to “normal” circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989. Vol. 86, № 15. P. 5859.
7. Hu D.E., Hori Y., Fan T.P.D. Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats // *Inflammation.* 1993. Vol. 17, № 2. P. 135–143.
8. Pekarek L.A. et al. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. // *J. Exp. Med.* 1995. Vol. 181, № 1. P. 435–440.
9. Fridlender Z.G. et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN // *Cancer Cell.* 2009. Vol. 16, № 3. P. 183–194.
10. Jablonska J. et al. Neutrophils responsive to endogenous IFN- β regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model // *J. Clin. Invest.* 2010. Vol. 120, № 4. P. 1151–1164.
11. Jablonska J. et al. CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN- β // *Int. J. Cancer.* 2014. Vol. 134, № 6. P. 1346–1358.
12. Andzinski L. et al. Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human // *Int. J. Cancer.* 2016. Vol. 138, № 8. P. 1982–1993.
13. Luyang H. et al. Bidirectional role of neutrophils in tumor development // *Mol. Cancer* 2025 241. 2025. Vol. 24, № 1. P. 1–16.
14. Huang S. et al. Metabolic reprogramming of neutrophils in the tumor microenvironment: Emerging therapeutic targets // *Cancer Lett.* 2025. Vol. 612. P. 217466.
15. De Filippo K., Rankin S.M. The Secretive Life of Neutrophils Revealed by Intravital Microscopy // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. Vol. 8. P. 603230.
16. Alshetaiwi H. et al. Defining the emergence of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer using single-cell transcriptomics // *Sci. Immunol.* 2020. Vol. 5, № 44. P. eaay6017.
17. Gätjen M. et al. Splenic marginal zone granulocytes acquire an accentuated neutrophil B-cell helper phenotype in chronic lymphocytic leukemia // *Cancer Res.* 2016. Vol. 76, № 18. P. 5253–5265.
18. Cortez-Retamozo V. et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. Vol. 109, № 7. P. 2491–2496.
19. Wang Y. et al. Glycolytic neutrophils accrued in the spleen compromise anti-tumour T cell immunity in breast cancer // *Nat. Metab.* 2023. Vol. 5, № 8. P. 1408–1422.
20. Pham H.T.T. et al. Neutrophil metalloproteinase driven spleen damage hampers infection control of trypanosomiasis // *Nat. Commun.* 2023. Vol. 14, № 1. P. 1–18.

21. Wu C., Hua Q., Zheng L. Generation of Myeloid Cells in Cancer: The Spleen Matters // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1126.
22. Xie X. et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection // *Nat. Immunol.* 2020. Vol. 21, № 9. P. 1119–1133.
23. Maali Y. et al. Two transcriptionally and functionally distinct waves of neutrophils during mouse acute liver injury // *Hepatol. Commun.* 2024. Vol. 8, № 7. P. e0459.
24. Berger-Achituv S. et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting // *Front. Immunol.* 2013. Vol. 4. P. 48.
25. Brinkmann V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria // *Science* (80-.). 2004. Vol. 303, № 5663. P. 1532–1535.
26. Mesa M.A., Vasquez G. NETosis // *Autoimmune Dis.* 2013. Vol. 2013, № 1. P. 651497.
27. Xu W. et al. NFE2-driven neutrophil polarization promotes pancreatic cancer liver metastasis progression // *Cell Rep.* 2025. Vol. 44, № 2. P. 115226.
28. Kaltenmeier C. et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cancer Metastasis // *Cancers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 23. P. 6131.
29. Lee W. et al. Neutrophil extracellular traps promote pre-metastatic niche formation in the omentum by expanding innate-like B cells that express IL-10. // *Cancer Cell.* 2024. Vol. 43, № 1. P. 69–85.
30. He X.Y. et al. Chronic stress increases metastasis via neutrophil-mediated changes to the microenvironment // *Cancer Cell.* 2024. Vol. 42, № 3. P. 474–486.
31. Zhai R. et al. Neutrophil extracellular traps promote invasion and metastasis via NLRP3-mediated oral squamous cell carcinoma pyroptosis inhibition // *Cell Death Discov.* 2024. Vol. 10, № 1. P. 1–15.
32. Liu K. et al. 5-HT orchestrates histone serotonylation and citrullination to drive neutrophil extracellular traps and liver metastasis // *J. Clin. Invest.* 2025. Vol. 135, № 8.
33. Cools-Lartigue J. et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis // *J. Clin. Invest.* 2013. Vol. 123, № 8. P. 3446–3458.
34. Xia X. et al. Neutrophil extracellular traps promote metastasis in gastric cancer patients with postoperative abdominal infectious complications // *Nat. Commun.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 1–14.
35. Ireland A.S., Oliver T.G. Neutrophils Create an ImpeNETrable Shield between Tumor and Cytotoxic Immune Cells // *Immunity.* 2020. Vol. 52, № 5. P. 729–731.
36. Ci Y. et al. Myricetin suppresses breast cancer metastasis through down-regulating the activity of matrix metalloproteinase (MMP)-2/9 // *Phyther. Res.* 2018. Vol. 32, № 7. P. 1373–1381.
37. Rayes T. El et al. Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. Vol. 112, № 52. P. 16000–16005.
38. Oklu R. et al. Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis // *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 2017. Vol. 7, № Suppl 3. P. S140–S149.
39. Tamkovich S.N. et al. Circulating DNA and DNase Activity in Human Blood // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006. Vol. 1075, № 1. P. 191–196.
40. Alekseeva L., Mironova N. Role of Cell-Free DNA and Deoxyribonucleases in Tumor Progression // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 22. P. 12246.
41. Cherepanova A. V. et al. Blood deoxyribonuclease activity in health and diseases // *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2007. Vol. 53, № 5. P. 488–496.

42. Alekseeva L. et al. Human Recombinant DNase I (Pulmozyme®) Inhibits Lung Metastases in Murine Metastatic B16 Melanoma Model That Correlates with Restoration of the DNase Activity and the Decrease SINE/LINE and c-Myc Fragments in Blood Cell-Free DNA // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 21. P. 12074.
43. Alexeeva L.A. et al. [Inhibition of Invasive Properties of Murine Melanoma by Bovine Pancreatic DNase I In Vitro and In Vivo] // *Mol. Biol. (Mosk).* 2017. Vol. 51, № 4. P. 637–646.
44. Alekseeva L.A. et al. Alteration of the exDNA profile in blood serum of LLC-bearing mice under the decrease of tumour invasion potential by bovine pancreatic DNase I treatment // *PLoS One.* 2017. Vol. 12, № 2. P. e0171988.
45. Patutina O.A. et al. Tumoricidal Activity of RNase A and DNase I // *Acta Naturae.* 2010. Vol. 2, № 1. P. 88.
46. Shklyayeva O.A. et al. Cancer-suppressive effect of RNase A and DNase I // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2008. Vol. 420, № 1. P. 108–111.
47. Alekseeva L.A. et al. Targeting Circulating SINEs and LINEs with DNase I Provides Metastases Inhibition in Experimental Tumor Models // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2020. Vol. 20. P. 50.
48. Rosner K. et al. Engineering a waste management enzyme to overcome cancer resistance to apoptosis: adding DNase I to the anti-cancer toolbox // *Cancer Gene Ther.* 2011. Vol. 18, № 5. P. 346–357.
49. Trejo-Becerril C. et al. Antitumor Effects of Systemic DNase I and Proteases in an in Vivo Model // *Integr. Cancer Ther.* 2016. Vol. 15, № 4. P. NP35–NP43.
50. Zhang H. et al. Neutrophils Extracellular Traps Inhibition Improves PD-1 Blockade Immunotherapy in Colorectal Cancer // *Cancers (Basel).* 2021. Vol. 13, № 21. P. 5333.
51. Sugihara S. et al. Deoxyribonuclease treatment prevents blood-borne liver metastasis of cutaneously transplanted tumour cells in mice // *Br. J. Cancer.* 1993. Vol. 67, № 1. P. 66–70.
52. Wen F. et al. Extracellular DNA in pancreatic cancer promotes cell invasion and metastasis // *Cancer Res.* 2013. Vol. 73, № 14. P. 4256–4266.
53. Abbas A., Lichtman A., Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 2011. 14 p.
54. Borregaard N., Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte // *Blood.* 1997. Vol. 89, № 10. P. 3503–3521.
55. Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? // *Front. Physiol.* 2018. Vol. 9. P. 1–17.
56. Mauler M. et al. Platelet-neutrophil complex formation- a detailed in vitro analysis of murine and human blood samples // *J. Leukoc. Biol.* 2016. Vol. 99, № 5. P. 781–789.
57. Sheshachalam A. et al. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils // *Front. Immunol.* 2014. Vol. 5. P. 1–11.
58. Mortaz E. et al. Update on neutrophil function in severe inflammation // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 1–14.
59. Yang L. et al. Neutrophils in Tissue Injury and Repair: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets // *MedComm.* 2025. Vol. 6, № 5. P. e70184.
60. Lawrence S.M., Corriden R., Nizet V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2018. Vol. 82, № 1.
61. Pillay J. et al. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days // *Blood.* 2010. Vol. 116, № 4. P. 625–627.
62. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis // *Blood.* 2016. Vol. 127, № 18. P. 2173–2181.

63. Thompson A.A.R. et al. Hypoxia-inducible factor 2 α regulates key neutrophil functions in humans, mice, and zebrafish // *Blood*. 2014. Vol. 123, № 3. P. 366–376.
64. Laval J. et al. Metabolic adaptation of neutrophils in cystic fibrosis airways involves distinct shifts in nutrient transporter expression // *J. Immunol.* 2013. Vol. 190, № 12. P. 6043–6050.
65. Peyssonnaud C. et al. HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes // *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115, № 7. P. 1806–1815.
66. Burn G.L. et al. The Neutrophil // *Immunity*. 2021. Vol. 54, № 7. P. 1377–1391.
67. Cowland J.B., Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils // *Immunol. Rev.* 2016. Vol. 273, № 1. P. 11–28.
68. Cassatella M.A. et al. Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines // *Trends Immunol.* 2019. Vol. 40, № 7. P. 648–664.
69. Burg N.D., Pillinger M.H. The Neutrophil: Function and Regulation in Innate and Humoral Immunity // *Clin. Immunol.* 2001. Vol. 99, № 1. P. 7–17.
70. Shah B., Burg N., Pillinger M.H. Neutrophils // *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*. Tenth Edit. 2017. P. 169–188.
71. Winterbourn C.C., Kettle A.J., Hampton M.B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function // *Annu. Rev. Biochem.* 2016. Vol. 85, № 1. P. 765–792.
72. Lee W.L., Harrison R.E., Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils // *Microbes Infect.* 2003. Vol. 5, № 14. P. 1299–1306.
73. Naish E. et al. The formation and function of the neutrophil phagosome // *Immunol. Rev.* 2023. Vol. 314, № 1. P. 158–180.
74. Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils // *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 2006. Vol. 2, № 3. P. 98–108.
75. Niedźwiedzka-Rystwej P. et al. “In sickness and in health” - How neutrophil extracellular trap (NET) works in infections, selected diseases and pregnancy // *J. Inflamm. (United Kingdom)*. 2019. Vol. 16, № 1. P. 1–8.
76. Zhang J., Miao C., Zhang H. Targeting neutrophil extracellular traps in cancer progression and metastasis // *Theranostics*. 2025. Vol. 15, № 12. P. 5846.
77. Weinrauch Y. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria // *Nature*. 2002. Vol. 417, № 6884. P. 91–94.
78. Flo T.H. et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron // *Nature*. 2004. Vol. 432, № 7019. P. 917–921.
79. Saffarzadeh M. et al. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 2. P. e32366.
80. Souto J.C., Vila L., Brú A. Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors // *Med. Res. Rev.* 2011. Vol. 31, № 3. P. 311–363.
81. Fridlender Z.G., Albelda S.M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? // *Carcinogenesis*. 2012. Vol. 33, № 5. P. 949–955.
82. Henon P., Gerota I., Palacios S. Functional abnormalities of neutrophils in cancer patients : inefficient phagocytosis and reverse endocytosis // *Biomed.* 1977. Vol. 27, № 7. P. 261–266.
83. Haim N. et al. Neutrophil function in cured cancer patients // *Cancer*. 1977. Vol. 40, № 5. P. 2273–2277.
84. Lisewicz J. et al. The enzymatic equipment of neutrophils in patients with precancerous

- states of the larynx // *Med Interne*. 1978. Vol. 16, № 1. P. 33–36.
85. Sułowicz W. Cytochemical study of neutrophils from peripheral blood of patients with lung cancer // *Med Interne*. 1985. Vol. 23, № 3. P. 195–200.
 86. Moshchynski P., Slovin'ski S., Moshchynski Jr P. Histochemical characteristics of neutrophils of the peripheral blood in patients with cancer of the stomach // *Vopr. Onkol.* 1988. Vol. 34, № 6. P. 682–685.
 87. Pizzo P.A. et al. A randomized trial comparing ceftazidime alone with combination antibiotic therapy in cancer patients with fever and neutropenia // *N. Engl. J. Med.* 1986. Vol. 315, № 9. P. 552–558.
 88. Silber J.H. et al. First-cycle blood counts and subsequent neutropenia, dose reduction, or delay in early-stage breast cancer therapy // *J. Clin. Oncol.* 1998. Vol. 16, № 7. P. 2392–2400.
 89. Zini G. Abnormalities in leukocyte morphology and number // *Blood and Bone Marrow Pathology*. second edition. 2011. P. 247–261.
 90. Tavares-Murta B.M. et al. Systemic leukocyte alterations are associated with invasive uterine cervical cancer // *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2010. Vol. 20, № 7. P. 1.
 91. Kim E. et al. Prognostic impact of neutrophilia and lymphopenia on survival in anal cancer treated with definitive concurrent chemoradiotherapy: a retrospective multicenter study // *Int. J. Clin. Oncol.* 2022. Vol. 27, № 3. P. 553–562.
 92. Song M. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in the United States general population // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–9.
 93. Nozawa H., Chiu C., Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103, № 33. P. 12493–12498.
 94. Queen M.M. et al. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65, № 19. P. 8896–8904.
 95. Di Carlo E. et al. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions // *Blood*. 2001. Vol. 97, № 2. P. 339–345.
 96. Knaapen A.M. et al. Neutrophils cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. Vol. 27, № 1–2. P. 234–240.
 97. Holub K., Conill C. Unveiling the mechanisms of immune evasion in pancreatic cancer: may it be a systemic inflammation responsible for dismal survival? // *Clin. Transl. Oncol.* 2020. Vol. 22, № 1. P. 81–90.
 98. Guthrie G.J.K. et al. The systemic inflammation-based neutrophil–lymphocyte ratio: Experience in patients with cancer // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2013. Vol. 88, № 1. P. 218–230.
 99. Faria S.S. et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio: a narrative review // *Ecancermedicalsecience*. 2016. Vol. 10. P. 702.
 100. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer // *Nature*. 2002. Vol. 420, № 6917. P. 860–867.
 101. Houghton A.M.G. The paradox of tumor-associated neutrophils: Fueling tumor growth with cytotoxic substances // *Cell Cycle*. 2010. Vol. 9, № 9. P. 1732–1737.
 102. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? // *Lancet*. 2001. Vol. 357, № 9255. P. 539–545.
 103. Niu F. et al. Arginase: An emerging and promising therapeutic target for cancer treatment // *Biomed. Pharmacother.* 2022. Vol. 149. P. 112840.
 104. Gregory A.D., Houghton A.M.G. Tumor-associated neutrophils: New targets for cancer

- therapy // *Cancer Research*. 2011. Vol. 71, № 7. P. 2411–2416.
105. Shaul M.E. et al. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF β modulation: A transcriptomics analysis of pro-vs. antitumor TANs // *Oncoimmunology*. 2016. Vol. 13, № 5. P. e1232221.
 106. Ohms M., Möller S., Laskay T. An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 532.
 107. Qin F. et al. Anti-TGF- β attenuates tumor growth via polarization of tumor associated neutrophils towards an anti-tumor phenotype in colorectal cancer // *J. Cancer*. 2020. Vol. 11, № 9. P. 2580–2592.
 108. Rubenich D.S. et al. Tumor-neutrophil crosstalk promotes in vitro and in vivo glioblastoma progression // *Front. Immunol.* 2023. Vol. 14. P. 1183465.
 109. Ng M. et al. Adaptations of neutrophils in cancer // *Immunity*. 2025. Vol. 58, № 1. P. 40–58.
 110. Wang X. et al. Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 2456.
 111. Munder M. et al. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase // *Blood*. 2006. Vol. 108, № 5. P. 1627–1634.
 112. Canè S. et al. Neutralization of NET-associated human ARG1 enhances cancer immunotherapy // *Sci. Transl. Med.* 2023. Vol. 15, № 687.
 113. Zhang H. et al. Annexin A2/TLR2/MYD88 pathway induces arginase 1 expression in tumor-associated neutrophils // *J. Clin. Invest.* 2022. Vol. 132, № 22.
 114. Vonwirth V. et al. Inhibition of Arginase 1 Liberates Potent T Cell Immunostimulatory Activity of Human Neutrophil Granulocytes // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 11. P. 617699.
 115. Mollinedo F. Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis // *Trends Immunol.* 2019. Vol. 40, № 3. P. 228–242.
 116. García-Navas R., Gajate C., Mollinedo F. Neutrophils drive endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in cancer cells through arginase-1 release // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–17.
 117. Linde I.L. et al. Neutrophil-activating therapy for the treatment of cancer // *Cancer Cell*. 2023. Vol. 41, № 2. P. 356–372.
 118. Gregory M.S. et al. Membrane Fas ligand activates innate immunity and terminates ocular immune privilege // *J. Immunol.* 2002. Vol. 169, № 5. P. 2727–2735.
 119. Sun B. et al. Neutrophil Suppresses Tumor Cell Proliferation via Fas /Fas Ligand Pathway Mediated Cell Cycle Arrested // *Int. J. Biol. Sci.* 2018. Vol. 14, № 14. P. 2103.
 120. Chung J.Y.F. et al. Smad3 is essential for polarization of tumor-associated neutrophils in non-small cell lung carcinoma // *Nat. Commun.* 2023. Vol. 14, № 1. P. 1–17.
 121. Finisguerra V. et al. MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils // *Nature*. 2015. Vol. 522, № 7556. P. 349–353.
 122. Sandhu J.K. et al. Neutrophils, Nitric Oxide Synthase, and Mutations in the Mutatect Murine Tumor Model // *Am. J. Pathol.* 2000. Vol. 156, № 2. P. 509.
 123. Virtuoso L.P. et al. Characterization of iNOS⁺ Neutrophil-like ring cell in tumor-bearing mice // *J. Transl. Med.* 2012. Vol. 10, № 1. P. 1–12.
 124. Yajuk O. et al. The PD-L1/PD-1 Axis Blocks Neutrophil Cytotoxicity in Cancer // *Cells*. 2021. Vol. 10, № 6. P. 1510.
 125. Pylaeva E. et al. During early stages of cancer, neutrophils initiate anti-tumor immune responses in tumor-draining lymph nodes // *Cell Rep.* 2022. Vol. 40, № 7.
 126. Tang D. et al. Tumor-Infiltrating PD-L1⁺ Neutrophils Induced by GM-CSF Suppress T

- Cell Function in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Predict Unfavorable Prognosis // *J. Inflamm. Res.* 2022. Vol. 15. P. 1079.
127. Wang T.T. et al. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway // *Gut*. 2017. Vol. 66, № 11. P. 1900–1911.
 128. Zhang S. et al. Tumor associated neutrophils governs tumor progression through an IL-10/STAT3/PD-L1 feedback signaling loop in lung cancer // *Transl. Oncol.* 2024. Vol. 40. P. 101866.
 129. Niu X. et al. Serum amyloid A 1 induces suppressive neutrophils through the Toll-like receptor 2-mediated signaling pathway to promote progression of breast cancer // *Cancer Sci.* 2022. Vol. 113, № 4. P. 1140.
 130. Zhou S.L. et al. Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib // *Gastroenterology*. 2016. Vol. 150, № 7. P. 1646–1658.
 131. Mishalian I. et al. Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17--a new mechanism of impaired antitumor immunity // *Int. J. cancer*. 2014. Vol. 135, № 5. P. 1178–1186.
 132. Wang S. et al. S100A8/A9 in inflammation // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 1298.
 133. Galdiero M.R. et al. Potential involvement of neutrophils in human thyroid cancer // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, № 6. P. e0199740.
 134. Massena S. et al. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans // *Blood*. 2015. Vol. 126, № 17. P. 2016–2026.
 135. Yang C. et al. Targeting the immune privilege of tumor-initiating cells to enhance cancer immunotherapy // *Cancer Cell*. 2024. Vol. 42, № 12. P. 2064–2081.
 136. Szlachetko J.A. et al. Tumor cells that resist neutrophil anticancer cytotoxicity acquire a prometastatic and innate immune escape phenotype // *Cell. Mol. Immunol.* 2025. Vol. 22, № 5. P. 527–540.
 137. Pember S. O et al. Density heterogeneity of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: gradient fractionation and relationship to chemotactic stimulation // *Blood*. 1983. Vol. 61, № 6. P. 1105–1115.
 138. Pember S., Kinkade J.J. Differences in Myeloperoxidase Activity From Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocytes of Differing Density: Relationship to Selective Exocytosis of Distinct Forms of the Enzyme // *Blood*. 1983. Vol. 61, № 6. P. 1116–1124.
 139. Brandau S. et al. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties // *J. Leukoc. Biol.* 2011. Vol. 89, № 2. P. 311–317.
 140. Sagiv J.Y. et al. Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer // *Cell Rep.* 2015. Vol. 10, № 4. P. 562–573.
 141. Hsu B.E. et al. Immature Low-Density Neutrophils Exhibit Metabolic Flexibility that Facilitates Breast Cancer Liver Metastasis // *Cell Rep.* 2019. Vol. 27, № 13. P. 3902–3915.
 142. Charoensappakit A. et al. Immune suppressive activities of low-density neutrophils in sepsis and potential use as a novel biomarker of sepsis-induced immune suppression // *Sci. Rep.* 2025. Vol. 15, № 1. P. 1–13.
 143. Sun R. et al. Dysfunction of low-density neutrophils in peripheral circulation in patients with sepsis // *Sci. Rep.* 2022. Vol. 12, № 1. P. 1–10.
 144. Midgley A., Beresford M.W. Increased expression of low density granulocytes in

- juvenile-onset systemic lupus erythematosus patients correlates with disease activity // *Lupus*. 2016. Vol. 25, № 4. P. 407–411.
145. Cloke T. et al. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 11. P. e48939.
 146. Scapini P. et al. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions // *Immunol. Rev.* 2016. Vol. 273, № 1. P. 48–60.
 147. Morrissey S.M. et al. A specific low-density neutrophil population correlates with hypercoagulation and disease severity in hospitalized COVID-19 patients // *JCI Insight*. 2021. Vol. 6, № 9. P. e148435.
 148. Kanamaru R. et al. Low density neutrophils (LDN) in postoperative abdominal cavity assist the peritoneal recurrence through the production of neutrophil extracellular traps (NETs) // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–10.
 149. Arasanz H. et al. Circulating Low Density Neutrophils Are Associated with Resistance to First Line Anti-PD1/PDL1 Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer // *Cancers (Basel)*. 2022. Vol. 14, № 16. P. 3846.
 150. Saraiva D.P. et al. Circulating low density neutrophils of breast cancer patients are associated with their worse prognosis due to the impairment of T cell responses // *Oncotarget*. 2021. Vol. 12, № 24. P. 2388–2403.
 151. Shaul M.E. et al. Circulating neutrophil subsets in advanced lung cancer patients exhibit unique immune signature and relate to prognosis // *FASEB J.* 2020. Vol. 34, № 3. P. 4204–4218.
 152. Zhu Y.P. et al. CyTOF mass cytometry reveals phenotypically distinct human blood neutrophil populations differentially correlated with melanoma stage // *J. Immunother. Cancer*. 2020. Vol. 8, № 2.
 153. Chen B. et al. Single-cell and spatial transcriptomics reveals an anti-tumor neutrophil subgroup in microwave thermochemotherapy-treated lip cancer // *Int. J. Oral Sci.* 2025. Vol. 17, № 1. P. 1–15.
 154. Fetit R. et al. Characterizing Neutrophil Subtypes in Cancer Using scRNA Sequencing Demonstrates the Importance of IL1 β /CXCR2 Axis in Generation of Metastasis-specific Neutrophils // *Cancer Res. Commun.* 2024. Vol. 4, № 2. P. 588.
 155. Gungabeesoon J. et al. A neutrophil response linked to tumor control in immunotherapy // *Cell*. 2023. Vol. 186, № 7. P. 1448–1464.e20.
 156. Wang L. et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals BHLHE40-driven pro-tumour neutrophils with hyperactivated glycolysis in pancreatic tumour microenvironment // *Gut*. 2023. Vol. 72, № 5. P. 958–971.
 157. Salcher S. et al. High-resolution single-cell atlas reveals diversity and plasticity of tissue-resident neutrophils in non-small cell lung cancer // *Cancer Cell*. 2022. Vol. 40, № 12. P. 1503–1520.
 158. Chen G., Ning B., Shi T. Single-cell RNA-seq technologies and related computational data analysis // *Front. Genet.* 2019. Vol. 10. P. 317.
 159. Zilionis R. et al. Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species // *Immunity*. 2019. Vol. 50, № 5. P. 1317–1334.
 160. Quail D.F. et al. Neutrophil phenotypes and functions in cancer: A consensus statement // *J. Exp. Med.* 2022. Vol. 219, № 6. P. e20220011.
 161. Valcenko A. et al. The tumor cell killing capacity of head and neck cancer patient-derived neutrophils depends on tumor stage, gender and the antibody isotype // *Oral Oncol.* 2024.

- Vol. 159. P. 107042.
162. Albanesi M. et al. Neutrophils mediate antibody-induced antitumor effects in mice // *Blood*. 2013. Vol. 122, № 18. P. 3160–3164.
 163. Möller E. Contact-Induced Cytotoxicity by Lymphoid Cells Containing Foreign Isoantigens // *Science* (80-.). 1965. Vol. 147, № 3660. P. 873–879.
 164. Zahavi D. et al. Enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: a strategy for improving antibody-based immunotherapy // *Antib. Ther.* 2018. Vol. 1, № 1. P. 7–12.
 165. Van Egmond M., Bakema J.E. Neutrophils as effector cells for antibody-based immunotherapy of cancer // *Semin. Cancer Biol.* 2013. Vol. 23, № 3. P. 190–199.
 166. Gershkovitz M. et al. TRPM2 Mediates Neutrophil Killing of Disseminated Tumor Cells // *Cancer Res.* 2018. Vol. 78, № 10. P. 2680–2690.
 167. Breitbach C.J. et al. Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus // *Mol. Ther.* 2011. Vol. 19, № 5. P. 886–894.
 168. Millrud C.R. et al. NET-producing CD16^{high} CD62L^{dim} neutrophils migrate to tumor sites and predict improved survival in patients with HNSCC // *Int. J. Cancer.* 2017. Vol. 140, № 11. P. 2557–2567.
 169. Matlung H.L. et al. Neutrophils Kill Antibody-Opsonized Cancer Cells by Trogoptosis // *Cell Rep.* 2018. Vol. 23, № 13. P. 3946–3959.
 170. Ponzetta A. et al. Neutrophils Driving Unconventional T Cells Mediate Resistance against Murine Sarcomas and Selected Human Tumors // *Cell.* 2019. Vol. 178, № 2. P. 346.
 171. Governa V. et al. The interplay between neutrophils and CD8⁺ T cells improves survival in human colorectal cancer // *Clin. Cancer Res.* 2017. Vol. 23, № 14. P. 3847–3858.
 172. Mensurado S. et al. Tumor-associated neutrophils suppress pro-tumoral IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cells through induction of oxidative stress // *PLoS Biol.* 2018. Vol. 16, № 5. P. e2004990.
 173. Wculek S.K. et al. Early Neutrophil Responses to Chemical Carcinogenesis Shape Long-Term Lung Cancer Susceptibility // *iScience.* 2020. Vol. 23, № 7. P. 101277.
 174. Shaul M.E. et al. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF β modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs // *Oncoimmunology.* 2016. Vol. 5, № 11. P. e1232221.
 175. Itatani Y. et al. Suppressing neutrophil-dependent angiogenesis abrogates resistance to anti-VEGF antibody in a genetic model of colorectal cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. Vol. 117, № 35. P. 21598–21608.
 176. Houghton A.M.G. et al. Neutrophil Elastase-Mediated Degradation of IRS-1 Accelerates Lung Tumor Growth // *Nat. Med.* 2010. Vol. 16, № 2. P. 219.
 177. Hattar K. et al. Interactions between neutrophils and non-small cell lung cancer cells: enhancement of tumor proliferation and inflammatory mediator synthesis // *Cancer Immunol. Immunother.* 2014. Vol. 63, № 12. P. 1297–1306.
 178. Lianyuan T. et al. Tumor associated neutrophils promote the metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma // *Cancer Biol. Ther.* 2020. Vol. 21, № 10. P. 937–945.
 179. Liang W., Li Q., Ferrara N. Metastatic growth instructed by neutrophil derived transferrin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018. Vol. 115, № 43. P. 11060–11065.
 180. Bellomo G. et al. Chemotherapy-induced infiltration of neutrophils promotes pancreatic cancer metastasis via Gas6/AXL signalling axis // *Gut.* 2022. Vol. 71, № 11. P. 2284–2299.
 181. De Meo M.L., Spicer J.D. The role of neutrophil extracellular traps in cancer progression and metastasis // *Semin. Immunol.* 2021. Vol. 57. P. 101595.
 182. Que H. et al. Tumor-associated neutrophils and neutrophil-targeted cancer therapies //

- Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer. 2022. Vol. 1877, № 5. P. 188762.
183. Bettadapur A., Miller H.W., Ralston K.S. Biting off what can be chewed: Trogocytosis in health, infection, and disease // *Infect. Immun.* 2020. Vol. 88, № 7. P. e00930-19.
 184. Joly E., Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose? // *Nat. Immunol.* 2003. Vol. 4, № 9. P. 815.
 185. Granot Z. et al. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung // *Cancer Cell.* 2011. Vol. 20, № 3. P. 300–314.
 186. Liu Q. et al. Radiotherapy programs neutrophils to an antitumor phenotype by inducing mesenchymal-epithelial transition // *Transl. Lung Cancer Res.* 2021. Vol. 10, № 3. P. 1424.
 187. Canli Ö. et al. Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis // *Cancer Cell.* 2017. Vol. 32, № 6. P. 869–883.
 188. Wilson C.L. et al. NFκB1 is a suppressor of neutrophil-driven hepatocellular carcinoma // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6, № 1. P. 1–15.
 189. Ma X. et al. Definition of prostaglandin E2-EP2 signals in the colon tumor microenvironment that amplify inflammation and tumor growth // *Cancer Res.* 2015. Vol. 75, № 14. P. 2822–2832.
 190. Antonio N. et al. The wound inflammatory response exacerbates growth of pre-neoplastic cells and progression to cancer // *EMBO J.* 2015. Vol. 34, № 17. P. 2219.
 191. Di Mitri D. et al. Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer // *Nature.* 2014. Vol. 515, № 7525. P. 134–137.
 192. Song W. et al. Infiltrating neutrophils promote renal cell carcinoma (RCC) proliferation via modulating androgen receptor (AR) → c-Myc signals // *Cancer Lett.* 2015. Vol. 368, № 1. P. 71–78.
 193. Li P. et al. Lung mesenchymal cells elicit lipid storage in neutrophils that fuel breast cancer lung metastasis // *Nat. Immunol.* 2020. Vol. 21, № 11. P. 1444–1455.
 194. Szczerba B.M. et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression // *Nature.* 2019. Vol. 566, № 7745. P. 553–557.
 195. Shojaei F. et al. Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 7. P. 2640–2645.
 196. Shojaei F. et al. Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis // *Nature.* 2007. Vol. 450, № 7171. P. 825–831.
 197. Seignez C., Phillipson M. The multitasking neutrophils and their involvement in angiogenesis // *Curr. Opin. Hematol.* 2017. Vol. 24, № 1. P. 3–8.
 198. Braile M. et al. LPS-mediated neutrophil VEGF-A release is modulated by cannabinoid receptor activation // *J. Leukoc. Biol.* 2021. Vol. 109, № 3. P. 621–631.
 199. Kuczynski E.A. et al. Vessel co-option in cancer // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2019. Vol. 16, № 8. P. 469–493.
 200. Wechman S.L. et al. Vascular mimicry: Triggers, molecular interactions and in vivo models // *Adv. Cancer Res.* 2020. Vol. 148. P. 27–67.
 201. Teuwen L.A. et al. Tumor vessel co-option probed by single-cell analysis // *Cell Rep.* 2021. Vol. 35, № 11. P. 109253.
 202. Tsai Y.M. et al. Cooperation Between Cancer and Fibroblasts in Vascular Mimicry and N2-Type Neutrophil Recruitment via Notch2-Jagged1 Interaction in Lung Cancer // *Front. Oncol.* 2021. Vol. 11. P. 696931.
 203. Yagi T. et al. Cancer-associated fibroblasts promote pro-tumor functions of neutrophils in

- pancreatic cancer via IL-8: potential suppression by pirfenidone // *Cancer Immunol. Immunother.* 2025. Vol. 74, № 3. P. 96.
204. Sun R. et al. Tumor-associated neutrophils suppress antitumor immunity of NK cells through the PD-L1/PD-1 axis // *Transl. Oncol.* 2020. Vol. 13, № 10. P. 100825.
 205. He G. et al. Peritumoural neutrophils negatively regulate adaptive immunity via the PD-L1/PD-1 signalling pathway in hepatocellular carcinoma // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2015. Vol. 34, № 1. P. 1–11.
 206. Kwantwi L.B. et al. Tumor-associated neutrophils activated by tumor-derived CCL20 (C-C motif chemokine ligand 20) promote T cell immunosuppression via programmed death-ligand 1 (PD-L1) in breast cancer // *Bioengineered.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 6996–7006.
 207. Martin-Orozco N. et al. Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8⁺ T cell tolerance to tissue antigens // *J. Immunol.* 2006. Vol. 177, № 12. P. 8291–8295.
 208. Dong H. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8, № 8. P. 793–800.
 209. White J.G., Estensen R.D. Selective Labilization of Specific Granules in Polymorphonuclear Leukocytes by Phorbol Myristate Acetate // *Am. J. Pathol.* 1974. Vol. 75, № 1. P. 45.
 210. Anker P., Stroun M., Maurice P.A. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system // *Cancer Res.* 1975. Vol. 35, № 9. P. 2375–2382.
 211. Jachertz D. et al. Information carried by the DNA released by antigen-stimulated lymphocytes. // *Immunology.* 1979. Vol. 37, № 4. P. 753.
 212. Rogers J.C. Identification of an intracellular precursor to DNA excreted by human lymphocytes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1976. Vol. 73, № 9. P. 3211–3215.
 213. Takei H. et al. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis // *J. Leukoc. Biol.* 1996. Vol. 59, № 2. P. 229–240.
 214. Kwak S. Bin et al. Tumor regionalization after surgery: Roles of the tumor microenvironment and neutrophil extracellular traps // *Exp. Mol. Med.* 2022. Vol. 54, № 6. P. 720.
 215. Yipp B.G. et al. Dynamic NETosis is Carried Out by Live Neutrophils in Human and Mouse Bacterial Abscesses and During Severe Gram-Positive Infection // *Nat. Med.* 2012. Vol. 18, № 9. P. 1386.
 216. Yousefi S. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps // *Cell Death Differ.* 2009. Vol. 16, № 11. P. 1438–1444.
 217. Arpinati L. et al. NETosis in cancer: a critical analysis of the impact of cancer on neutrophil extracellular trap (NET) release in lung cancer patients vs. mice // *Cancer Immunol. Immunother.* 2020. Vol. 69, № 2. P. 199–213.
 218. Stehr A.M. et al. Neutrophil extracellular traps drive epithelial-mesenchymal transition of human colon cancer // *J. Pathol.* 2022. Vol. 256, № 4. P. 455–467.
 219. Lee W.J. et al. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum // *J. Exp. Med.* 2019. Vol. 216, № 1. P. 176.
 220. Telerman A. et al. Neutrophil extracellular traps are increased in chronic myeloid leukemia and are differentially affected by tyrosine kinase inhibitors // *Cancers (Basel).* 2022. Vol. 14, № 1. P. 119.
 221. McInturff A.M. et al. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha // *Blood.* 2012. Vol. 120,

- № 15. P. 3118.
222. Park J. et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps // *Sci. Transl. Med.* 2016. Vol. 8, № 361.
 223. Zhu T. et al. Neutrophil extracellular traps promote gastric cancer metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition // *Int. J. Mol. Med.* 2021. Vol. 48, № 1. P. 127.
 224. Jin W. et al. Tumor-Infiltrating NETs Predict Postsurgical Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma // *Ann. Surg. Oncol.* 2019. Vol. 26, № 2. P. 635–643.
 225. Nie M. et al. Neutrophil Extracellular Traps Induced by IL8 Promote Diffuse Large B-cell Lymphoma Progression via the TLR9 Signaling // *Clin. Cancer Res.* 2019. Vol. 25, № 6. P. 1867–1879.
 226. Rayes R.F. et al. Primary tumors induce neutrophil extracellular traps with targetable metastasis promoting effects // *JCI insight.* 2019. Vol. 5, № 16. P. e128008.
 227. Li Z. et al. Cancer-associated fibroblasts promote PD-L1 expression in mice cancer cells via secreting CXCL5 // *Int. J. Cancer.* 2019. Vol. 145, № 7. P. 1946.
 228. Proost P. et al. Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10, and IL-8. // *J. Immunol.* 1993. Vol. 150, № 3. P. 1000–1010.
 229. Ogawa R. et al. Loss of Smad4 promotes colorectal cancer progression by recruiting tumor-associated neutrophils via the CXCL1/8–CXCR2 axis // *Clin. Cancer Res.* 2019. Vol. 25, № 9. P. 2887–2899.
 230. Munir H. et al. Stromal-driven and Amyloid β -dependent induction of neutrophil extracellular traps modulates tumor growth // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 683.
 231. Timaxian C. et al. Pivotal role for cxcr2 in regulating tumor-associated neutrophil in breast cancer // *Cancers (Basel).* 2021. Vol. 13, № 11. P. 2584.
 232. Yazdani H.O. et al. Neutrophil Extracellular Traps Drive Mitochondrial Homeostasis in Tumors to Augment Growth // *Cancer Res.* 2019. Vol. 79, № 21. P. 5626–5639.
 233. Miller-Ocuin J.L. et al. DNA released from neutrophil extracellular traps (NETs) activates pancreatic stellate cells and enhances pancreatic tumor growth // *Oncoimmunology.* 2019. Vol. 8, № 9. P. e1605822.
 234. Yang L. et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25 // *Nature.* 2020. Vol. 583, № 7814. P. 133–138.
 235. Wang H. et al. Regulatory T-cell and neutrophil extracellular trap interaction contributes to carcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis // *J. Hepatol.* 2021. Vol. 75, № 6. P. 1271–1283.
 236. van der Windt D.J. et al. Neutrophil extracellular traps promote inflammation and development of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis // *Hepatology.* 2018. Vol. 68, № 4. P. 1347.
 237. Albrengues J. et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice // *Science.* 2018. Vol. 361, № 6409. P. eaao4227.
 238. Xiao Y. et al. Cathepsin C promotes breast cancer lung metastasis by modulating neutrophil infiltration and neutrophil extracellular trap formation // *Cancer Cell.* 2021. Vol. 39, № 3. P. 423–437.
 239. Hsu B.E. et al. C3a elicits unique migratory responses in immature low-density neutrophils // *Oncogene.* 2020. Vol. 39, № 12. P. 2612–2623.
 240. Nabizadeh J.A. et al. The Complement C3a Receptor Contributes to Melanoma Tumorigenesis by Inhibiting Neutrophil and CD4⁺ T Cell Responses // *J. Immunol.* 2016. Vol. 196, № 11. P. 4783–4792.
 241. Mao Z. et al. CXCL5 promotes gastric cancer metastasis by inducing epithelial-

- mesenchymal transition and activating neutrophils // *Oncogenesis*. 2020. Vol. 9, № 7. P. 63.
242. Yan M. et al. Roles of tumor-associated neutrophils in tumor metastasis and its clinical applications // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. Vol. 10. P. 938289.
 243. Verbeke H. et al. Isotypic neutralizing antibodies against mouse GCP-2/CXCL6 inhibit melanoma growth and metastasis // *Cancer Lett.* 2011. Vol. 302, № 1. P. 54–62.
 244. Flint T.R. et al. Tumor-Induced IL-6 Reprograms Host Metabolism to Suppress Anti-tumor Immunity // *Cell Metab.* 2016. Vol. 24, № 5. P. 672.
 245. Leal A.C. et al. Tumor-Derived Exosomes Induce the Formation of Neutrophil Extracellular Traps: Implications For The Establishment of Cancer-Associated Thrombosis // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–12.
 246. Qi M. et al. Lin28B-high breast cancer cells promote immune suppression in the lung pre-metastatic niche via exosomes and support cancer progression // *Nat. Commun.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 897.
 247. Schuldner M. et al. Exosome-dependent immune surveillance at the metastatic niche requires BAG6 and CBP/p300-dependent acetylation of p53 // *Theranostics*. 2019. Vol. 9, № 21. P. 6047–6062.
 248. Zhang X. et al. Tumor-derived exosomes induce N2 polarization of neutrophils to promote gastric cancer cell migration // *Mol. Cancer*. 2018. Vol. 17, № 1. P. 1–16.
 249. Demers M. et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. Vol. 109, № 32. P. 13076–13081.
 250. Gupta A.K. et al. Induction of Neutrophil Extracellular DNA Lattices by Placental Microparticles and IL-8 and Their Presence in Preeclampsia // *Hum. Immunol.* 2005. Vol. 66, № 11. P. 1146–1154.
 251. An Z. et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- κ B signaling in macrophages // *Cell Cycle*. 2019. Vol. 18, № 21. P. 2928.
 252. Keshari R.S. et al. Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 10. P. 48111.
 253. Trellakis S. et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: Enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease // *Int. J. Cancer*. 2011. Vol. 129, № 9. P. 2183–2193.
 254. David J.M. et al. The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance // *Vaccines*. 2016. Vol. 4, № 3. P. 22.
 255. Zhang Y. et al. Interleukin-17-induced neutrophil extracellular traps mediate resistance to checkpoint blockade in pancreatic cancer // *J. Exp. Med.* 2020. Vol. 217, № 12. P. e20190354.
 256. Mollaoglu G. et al. The Lineage-Defining Transcription Factors SOX2 and NKX2-1 Determine Lung Cancer Cell Fate and Shape the Tumor Immune Microenvironment // *Immunity*. 2018. Vol. 49, № 4. P. 764–779.
 257. Nielsen S.R. et al. Suppression of tumor-associated neutrophils by lorlatinib attenuates pancreatic cancer growth and improves treatment with immune checkpoint blockade // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 1–15.
 258. Spiegel A. et al. Neutrophils suppress intraluminal NK-mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells // *Cancer Discov.* 2016. Vol. 6, № 6. P. 630.
 259. Wang P.F. et al. Neutrophil depletion enhances the therapeutic effect of PD-1 antibody on

- glioma // Aging (Albany, NY). 2020. Vol. 12, № 15. P. 15290–15301.
260. Harris J.D. et al. Engineered anti-prostate cancer CAR-neutrophils from human pluripotent stem cells // J. Immunol. Regen. Med. 2023. Vol. 20. P. 100074.
 261. Chang Y. et al. CAR-neutrophil mediated delivery of tumor-microenvironment responsive nanodrugs for glioblastoma chemo-immunotherapy // Nat. Commun. 2023. Vol. 14, № 1. P. 1–17.
 262. Chang Y. et al. Engineering chimeric antigen receptor neutrophils from human pluripotent stem cells for targeted cancer immunotherapy // Cell Rep. 2022. Vol. 40, № 3.
 263. SenGupta S., Subramanian B.C., Parent C.A. Getting TANned: How the tumor microenvironment drives neutrophil recruitment // J. Leukoc. Biol. 2019. Vol. 105, № 3. P. 449–462.
 264. SenGupta S., Hein L.E., Parent C.A. The Recruitment of Neutrophils to the Tumor Microenvironment Is Regulated by Multiple Mediators // Front. Immunol. 2021. Vol. 12. P. 734188.
 265. Rivera J. et al. Deciphering neutrophil dynamics in the focal lesion tumor microenvironment to overcome immunosuppression in multiple myeloma // Blood. 2025. Vol. blood-2025.
 266. Zhang H. et al. CXCL2/MIF-CXCR2 signaling promotes the recruitment of myeloid-derived suppressor cells and is correlated with prognosis in bladder cancer // Oncogene. 2017. Vol. 36, № 15. P. 2095–2104.
 267. SenGupta S. et al. Triple-Negative Breast Cancer Cells Recruit Neutrophils by Secreting TGF- β and CXCR2 Ligands // Front. Immunol. 2021. Vol. 12. P. 659996.
 268. Wu L. et al. IL-17–CXC Chemokine Receptor 2 Axis Facilitates Breast Cancer Progression by Up-Regulating Neutrophil Recruitment // Am. J. Pathol. 2020. Vol. 190, № 1. P. 222–233.
 269. Ha H., Debnath B., Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases // Theranostics. 2017. Vol. 7, № 6. P. 1543.
 270. Wang H. et al. KIAA1199 drives immune suppression to promote colorectal cancer liver metastasis by modulating neutrophil infiltration // Hepatology. 2022. Vol. 76, № 4. P. 967–981.
 271. Groth C. et al. Blocking Migration of Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibits Mouse Melanoma Progression // Cancers (Basel). 2021. Vol. 13, № 4. P. 1–20.
 272. Mittmann L.A. et al. Uncoupled biological and chronological aging of neutrophils in cancer promotes tumor progression // J. Immunother. Cancer. 2021. Vol. 9, № 12. P. e003495.
 273. Yang J. et al. Targeted Deletion of CXCR2 in Myeloid Cells Alters the Tumor ImmuneEnvironment to Improve Antitumor Immunity // Cancer Immunol. Res. 2021. Vol. 9, № 2. P. 200.
 274. Ghallab A.M., Eissa R.A., El Tayebi H.M. CXCR2 Small-Molecule Antagonist Combats Chemoresistance and Enhances Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer // Front. Pharmacol. 2022. Vol. 13. P. 862125.
 275. Napoli M. et al. The dual non-competitive CXCR1/2 inhibitor ladarixin impairs neutrophil extravasation without altering intravascular adhesion // Haematologica. 2025.
 276. Amorim C. et al. Extracellular Vesicles Derived from MDA-MB-231 Cells Trigger Neutrophils to a Pro-Tumor Profile // Cells. 2022. Vol. 11, № 12. P. 1875.
 277. Danielpour D. Advances and Challenges in Targeting TGF- β Isoforms for Therapeutic Intervention of Cancer: A Mechanism-Based Perspective // Pharmaceuticals. 2024. Vol.

- 17, № 4. P. 533.
278. Batlle E., Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer // *Immunity*. 2019. Vol. 50, № 4. P. 924–940.
 279. Jackstadt R. et al. Epithelial NOTCH Signaling Rewires the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer to Drive Poor-Prognosis Subtypes and Metastasis // *Cancer Cell*. 2019. Vol. 36, № 3. P. 319–336.
 280. Haider C. et al. Transforming Growth Factor- β and Axl Induce CXCL5 and Neutrophil Recruitment in Hepatocellular Carcinoma // *Hepatology*. 2019. Vol. 69, № 1. P. 222–236.
 281. Kim B.G. et al. Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- β pathway // *J. Hematol. Oncol.* 2021. Vol. 14, № 1. P. 1–20.
 282. De Los Reyes A.A., Kim Y. Optimal regulation of tumour-associated neutrophils in cancer progression // *R. Soc. Open Sci.* 2022. Vol. 9, № 2. P. 210705.
 283. Fang Y. et al. Blocking TGF- β Expression Attenuates Tumor Growth in Lung Cancers, Potentially Mediated by Skewing Development of Neutrophils // *J. Oncol.* 2022. Vol. 2022, № 1. P. 3447185.
 284. Huang X. et al. Dual-responsive nanosystem based on TGF- β blockade and immunogenic chemotherapy for effective chemoimmunotherapy // *Drug Deliv.* 2022. Vol. 29, № 1. P. 1358–1369.
 285. Song S. et al. Blocking transforming growth factor-beta reduces the migration and invasion of the residual tumour after TAE // *Am. J. Transl. Res.* 2019. Vol. 11, № 4. P. 2155.
 286. Yang T. et al. TGF- β receptor inhibitor LY2109761 enhances the radiosensitivity of gastric cancer by inactivating the TGF- β /SMAD4 signaling pathway // *Aging (Albany. NY)*. 2019. Vol. 11, № 20. P. 8892–8910.
 287. Li Z. et al. Emodin regulates neutrophil phenotypes to prevent hypercoagulation and lung carcinogenesis // *J. Transl. Med.* 2019. Vol. 17, № 1. P. 1–15.
 288. Yam A.O. et al. Neutrophil Conversion to a Tumor-Killing Phenotype Underpins Effective Microbial Therapy // *Cancer Res.* 2023. Vol. 83, № 8. P. 1315–1328.
 289. Kalafati L. et al. Innate Immune Training of Granulopoiesis Promotes Anti-tumor Activity // *Cell*. 2020. Vol. 183, № 3. P. 771–785.
 290. Kwak J.W., Houghton A.M.G. Targeting neutrophils for cancer therapy // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2025. P. 1–19.
 291. Ortiz-Espinosa S. et al. Complement C5a induces the formation of neutrophil extracellular traps by myeloid-derived suppressor cells to promote metastasis // *Cancer Lett.* 2022. Vol. 529. P. 70–84.
 292. Kajioka H. et al. Targeting neutrophil extracellular traps with thrombomodulin prevents pancreatic cancer metastasis // *Cancer Lett.* 2021. Vol. 497. P. 1–13.
 293. Jiang Z.Z. et al. Neutrophil extracellular traps induce tumor metastasis through dual effects on cancer and endothelial cells // *Oncoimmunology*. 2022. Vol. 11, № 1. P. 2052418.
 294. Wang Z. et al. Tumor-derived HMGB1 induces CD62L dim neutrophil polarization and promotes lung metastasis in triple-negative breast cancer // *Oncogenesis*. 2020. Vol. 9, № 9. P. 82.
 295. Teixeira Á. et al. CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps that Interfere with Immune Cytotoxicity // *Immunity*. 2020. Vol. 52, № 5. P. 856–871.
 296. Shahzad M.H. et al. Neutrophil Extracellular Traps in Cancer Therapy Resistance // *Cancers (Basel)*. 2022. Vol. 14, № 5. P. 1359.

297. Shinde-Jadhav S. et al. Role of neutrophil extracellular traps in radiation resistance of invasive bladder cancer // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 2776.
298. Li M. et al. A Novel Peptidylarginine Deiminase 4 (PAD4) Inhibitor BMS-P5 Blocks Formation of Neutrophil Extracellular Traps and Delays Progression of Multiple Myeloma // *Mol. Cancer Ther.* 2020. Vol. 19, № 7. P. 1530–1538.
299. Deng H. et al. A novel selective inhibitor JBI-589 targets PAD4-mediated neutrophil migration to suppress tumor progression // *Cancer Res.* 2022. Vol. 82, № 19. P. 3561–3572.
300. Adrover J.M. et al. Neutrophils drive vascular occlusion, tumour necrosis and metastasis // *Nature.* 2025. Vol. 645, № 8080. P. 484–495.
301. Wolach O. et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms // *Sci. Transl. Med.* 2018. Vol. 10, № 436. P. eaan8292.
302. Li J.C. et al. Neutrophil extracellular traps participate in the development of cancer-associated thrombosis in patients with gastric cancer // *World J. Gastroenterol.* 2022. Vol. 28, № 26. P. 3132–3149.
303. Várady C.B.S. et al. Recombinant human DNase I for the treatment of cancer-associated thrombosis: A pre-clinical study // *Thromb. Res.* 2021. Vol. 203. P. 131–137.
304. Hisada Y. et al. Neutrophils and neutrophil extracellular traps enhance venous thrombosis in mice bearing human pancreatic tumors // *Haematologica.* 2019. Vol. 105, № 1. P. 218–225.
305. Xia Y. et al. AAV-mediated gene transfer of DNase I in the liver of mice with colorectal cancer reduces liver metastasis and restores local innate and adaptive immune response // *Mol. Oncol.* 2020. Vol. 14, № 11. P. 2920.
306. Herre M. et al. AAV-mouse DNase I sustains long-term DNase I expression in vivo and suppresses breast cancer metastasis // *FASEB BioAdvances.* 2024. Vol. 6, № 10. P. 454–466.
307. Sun Y. et al. Inhalable DNase I@Au hybrid nanoparticles for radiation sensitization and metastasis inhibition by elimination of neutrophil extracellular traps // *Biomaterials.* 2025. Vol. 317. P. 123095.
308. Chen J. et al. Localized Degradation of Neutrophil Extracellular Traps by Photoregulated Enzyme Delivery for Cancer Immunotherapy and Metastasis Suppression // *ACS Nano.* 2022. Vol. 16, № 2. P. 2585–2597.
309. Cheng Y. et al. Injectable adhesive hemostatic gel with tumor acidity neutralizer and neutrophil extracellular traps lyase for enhancing adoptive NK cell therapy prevents post-resection recurrence of hepatocellular carcinoma // *Biomaterials.* 2022. Vol. 284. P. 121506.
310. Chen D. et al. Exenatide enhanced the antitumor efficacy on PD-1 blockade by the attenuation of neutrophil extracellular traps // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022. Vol. 619. P. 97–103.
311. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 13. P. 3406–3415.
312. Pfaffl M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations // *Biotechnol. Lett.* 2004. Vol. 26, № 6. P. 509–515.
313. Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64, № 15. P. 5245–5250.

314. Vandesompele J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. // *Genome Biol.* 2002. Vol. 3, № 7. P. 1–12.
315. Silver N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR // *BMC Mol. Biol.* 2006. Vol. 7, № 1. P. 1–9.
316. Xie F., Wang J., Zhang B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes // *Funct. Integr. Genomics.* 2023. Vol. 23, № 2. P. 1–5.
317. Mironova N. et al. Animal Model of Drug-Resistant Tumor Progression // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006. Vol. 1091, № 1. P. 490–500.
318. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method // *Methods.* 2001. Vol. 25, № 4. P. 402–408.
319. Sgouras D., Duncan R. Methods for the evaluation of biocompatibility of soluble synthetic polymers which have potential for biomedical use: 1 - Use of the tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) as a preliminary screen for evaluation of in vitro cytotoxicity // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1990. Vol. 1, № 2. P. 61–68.
320. Krémer V. et al. Isolation methods determine human neutrophil responses after stimulation // *Front. Immunol.* 2023. Vol. 14. P. 1301183.
321. Swamydas M., Lionakis M.S. Isolation, purification and labeling of mouse bone marrow neutrophils for functional studies and adoptive transfer experiments // *J. Vis. Exp.* 2013. № 77. P. 50586.
322. Boxio R. et al. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils // *J. Leukoc. Biol.* 2004. Vol. 75, № 4. P. 604–611.
323. Bucher K. et al. Deficiency of PI3-Kinase catalytic isoforms p110 γ and p110 δ in mice enhances the IL-17/G-CSF axis and induces neutrophilia // *Cell Commun. Signal.* 2017. Vol. 15, № 1. P. 28.
324. Jia X. et al. Metformin Reverses Hashimoto's Thyroiditis by Regulating Key Immune Events // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9. P. 685522.
325. Coquery C.M. et al. Optimized Protocol for the Isolation of Spleen-Resident Murine Neutrophils // *Cytometry. A.* 2012. Vol. 81, № 9. P. 806.
326. Hoult J.R.S., Nourshargh S. Phorbol myristate acetate enhances human polymorphonuclear neutrophil release of granular enzymes but inhibits chemokinesis // *Br. J. Pharmacol.* 1985. Vol. 86, № 3. P. 533–537.
327. Inozemtsev V. et al. Stages of NETosis Development upon Stimulation of Neutrophils with Activators of Different Types // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, № 15. P. 12355.
328. Pieterse E. et al. Neutrophils discriminate between lipopolysaccharides of different bacterial sources and selectively release neutrophil extracellular traps // *Front. Immunol.* 2016. Vol. 7, № NOV. P. 1–13.
329. Marin Oyarzún C.P. et al. Neutrophil extracellular trap formation and circulating nucleosomes in patients with chronic myeloproliferative neoplasms // *Sci. Reports* 2016 61. 2016. Vol. 6, № 1. P. 1–13.
330. Hensel J.A. et al. Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations // *Lab. Investig.* 2019. Vol. 99, № 1. P. 93–106.
331. Strydom N., Rankin S.M. Regulation of Circulating Neutrophil Numbers under Homeostasis and in Disease // *J. Innate Immun.* 2013. Vol. 5, № 4. P. 304.
332. Doeing D.C., Borowicz J.L., Crockett E.T. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods // *BMC Clin. Pathol.* 2003. Vol. 3, № 1. P. 3.

333. Douđa D.N. et al. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. Vol. 112, № 9. P. 2817–2822.
334. Hoppenbrouwers T. et al. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, № 5. P. e0176472.
335. Ståhl A.L. et al. Shiga toxin and lipopolysaccharide induce platelet-leukocyte aggregates and tissue factor release, a thrombotic mechanism in hemolytic uremic syndrome // *PLoS One*. 2009. Vol. 4, № 9. P. e6990.
336. Deniset J.F. et al. Splenic Ly6G^{high} mature and Ly6G^{int} immature neutrophils contribute to eradication of *S. pneumoniae* // *J. Exp. Med.* 2017. Vol. 214, № 5. P. 1333–1350.
337. Thellin O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits // *J. Biotechnol.* 1999. Vol. 75, № 2–3. P. 291–295.
338. Joshi C.J. et al. What are housekeeping genes? // *PLoS Comput. Biol.* 2022. Vol. 18, № 7. P. e1010295.
339. Bustin S.A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // *Clin. Chem.* 2009. Vol. 55, № 4. P. 611–622.
340. Geigges M. et al. Reference Genes for Expression Studies in Human CD8⁺ Naïve and Effector Memory T Cells under Resting and Activating Conditions // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–12.
341. Hendriks-Balk M.C., Michel M.C., Alewijnse A.E. Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data // *Basic Res. Cardiol.* 2007. Vol. 102, № 3. P. 195–197.
342. Kim S. et al. YWHAZ and TBP are potential reference gene candidates for qPCR analysis of response to radiation therapy in colorectal cancer // *Sci. Rep.* 2023. Vol. 13, № 1. P. 1–12.
343. Foquet B., Song H. There is no magic bullet: The importance of testing reference gene stability in RT-qPCR experiments across multiple closely related species // *PeerJ*. 2020. Vol. 8. P. e9618.
344. Garratt L.W. Current Understanding of the Neutrophil Transcriptome in Health and Disease // *Cells*. 2021. Vol. 10, № 9. P. 2406.
345. Ledderose C. et al. Selection of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in human T cells and neutrophils // *BMC Res. Notes*. 2011. Vol. 4, № 1. P. 427.
346. Zhang X., Ding L., Sandford A.J. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR // *BMC Mol. Biol.* 2005. Vol. 6, № 1. P. 4.
347. Vorachek W.R., Bobe G., Hall J.A. Reference gene selection for quantitative PCR studies in bovine neutrophils // *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2013. Vol. 04, № 10. P. 6–14.
348. Crookenden M.A. et al. Technical note: Evaluation of endogenous control gene expression in bovine neutrophils by reverse-transcription quantitative PCR using microfluidics gene expression arrays // *J. Dairy Sci.* 2017. Vol. 100, № 8. P. 6763–6771.
349. Vorachek W.R. et al. Reference gene selection for quantitative PCR studies in sheep neutrophils // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14, № 6. P. 11484–11495.
350. De Ketelaere A. et al. Technical note: Validation of internal control genes for gene expression analysis in bovine polymorphonuclear leukocytes // *J. Dairy Sci.* 2006. Vol. 89, № 10. P. 4066–4069.
351. Kouadjo K.E. et al. Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues // *BMC Genomics*. 2007. Vol. 8, № 1. P. 127.
352. Kozera B., Rapacz M. Reference genes in real-time PCR // *J. Appl. Genet.* 2013. Vol. 54, № 4. P. 391.

353. Chapman J.R., Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 11. P. e0141853.
354. Sugiura K., Stock C.C. Studies in a tumor spectrum. III. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors // Cancer Res. 1955. Vol. 15, № 1. P. 38–51.
355. Taylor S. et al. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines // Methods. 2010. Vol. 50, № 4. P. S1–S5.
356. Sundaram V.K. et al. Optimal use of statistical methods to validate reference gene stability in longitudinal studies // PLoS One. 2019. Vol. 14, № 7. P. e0219440.
357. Bunnell T.M. et al. β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool // Mol. Biol. Cell. 2011. Vol. 22, № 21. P. 4047–4058.
358. Sprengeler E.G.G. et al. Formation of neutrophil extracellular traps requires actin cytoskeleton rearrangements // Blood. 2022. Vol. 139, № 21. P. 3166–3180.
359. 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.
360. Yang Y. et al. Efficient Targeting Drug Delivery System for Lewis Lung Carcinoma, Leading to Histomorphological Abnormalities Restoration, Physiological and Psychological Statuses Improvement, and Metastasis Inhibition // Mol. Pharm. 2018. Vol. 15, № 5. P. 2007–2016.
361. Giavazzi R., Decio A. Syngeneic murine metastasis models: B16 melanoma // Methods Mol. Biol. 2014. Vol. 1070. P. 131–140.
362. Fidler I.J. Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival in Vivo // Cancer Res. 1975. Vol. 35, № 1. P. 218–224.
363. Overwijk W.W., Restifo N.P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma // Curr. Protoc. Immunol. 2001. Vol. 39, № 1. P. 20.1.1–20.1.29.
364. Sen'kova A. V. et al. The Toxic Effects of Polychemotherapy onto the Liver Are Accelerated by the Upregulated MDR of Lymphosarcoma // ISRN Oncol. 2012. Vol. 2012, № 1. P. 1–15.
365. Mirlekar B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy // SAGE Open Med. 2022. Vol. 10. P. 20503121211069012.
366. Freeman G.J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation // J. Exp. Med. 2000. Vol. 192, № 7. P. 1027–1034.
367. Chen Q. et al. Enhancing PD-1 Inhibitor Efficacy in Cholangiocarcinoma by Reprogramming Tumor-Associated Neutrophils With CAF-Derived Extracellular Vesicles Loaded with Ruxolitinib // Adv. Funct. Mater. 2025. P. 2423217.
368. Gao L. et al. Endothelial cell-derived CD95 ligand serves as a chemokine in induction of neutrophil slow rolling and adhesion // Elife. 2016. Vol. 5, № 2016. P. e18542.
369. Blankenstein T. et al. The determinants of tumour immunogenicity // Nat. Rev. Cancer. 2012. Vol. 12, № 4. P. 307.
370. Alrhoun S., Sennikov S. The Role of Tumor-Associated Antigen HER2/neu in Tumor Development and the Different Approaches for Using It in Treatment: Many Choices and Future Directions // Cancers (Basel). 2022. Vol. 14, № 24. P. 6173.
371. Rosner K. DNase1: A new personalized therapy for cancer? // Expert Rev. Anticancer Ther. 2011. Vol. 11, № 7. P. 983–986.
372. Volkov D. V. et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs): Opportunities for Targeted

- Therapy // *Acta Naturae*. 2021. Vol. 13, № 3. P. 15–23.
373. Hawes M.C., Wen F., Elquza E. Extracellular DNA: A bridge to cancer // *Cancer Res*. 2015. Vol. 75, № 20. P. 4260–4264.
 374. Li W. et al. DNASE1L3 enhances antitumor immunity and suppresses tumor progression in colon cancer // *JCI insight*. 2023. Vol. 8, № 17. P. e168161.
 375. Alekseeva L.A. et al. Pulmozyme Ameliorates LPS-Induced Lung Fibrosis but Provokes Residual Inflammation by Modulating Cell-Free DNA Composition and Controlling Neutrophil Phenotype // *Biomolecules*. 2025. Vol. 15, № 2. P. 298.
 376. Chen D. et al. DNASE1L3-expressing dendritic cells promote CD8+ T cell function and anti-PD-(L)1 therapy efficacy by degrading neutrophil extracellular traps // *Cancer Cell*. 2025. Vol. 43, № 9. P. 1758-1775.e8.
 377. Ozel I. et al. Neutrophil-specific targeting of STAT3 impairs tumor progression via the expansion of cytotoxic CD8+ T cells // *Signal Transduct. Target. Ther*. 2025. Vol. 10, № 1. P. 1–16.
 378. Zhu Q. et al. The IL-6–STAT3 axis mediates a reciprocal crosstalk between cancer-derived mesenchymal stem cells and neutrophils to synergistically prompt gastric cancer progression // *Cell Death Dis*. 2014. Vol. 5, № 6. P. e1295–e1295.
 379. Wu Y. et al. NETs-CD44-IL-17A Feedback Loop Drives Th17-Mediated Inflammation in Behçet's Uveitis // *Adv. Sci*. 2025. Vol. 12, № 16. P. 2411524.
 380. Su M. et al. Gasdermin D-dependent platelet pyroptosis exacerbates NET formation and inflammation in severe sepsis // *Nat. Cardiovasc. Res*. 2022. Vol. 1, № 8. P. 732–747.
 381. Ma Z. et al. Molecular Mechanisms of Neutrophil Extracellular Traps in Promoting Gastric Cancer Epithelial–Mesenchymal Transition Through SERPINE-1 Expression // *J. Biochem. Mol. Toxicol*. 2025. Vol. 39, № 3. P. e70157.
 382. Carminita E. et al. DNase-dependent, NET-independent pathway of thrombus formation in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2021. Vol. 118, № 28. P. e2100561118.
 383. Pan Z. et al. VSIG4+ tumor-associated macrophages mediate neutrophil infiltration and impair antigen-specific immunity in aggressive cancers through epigenetic regulation of SPP1 // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2025. Vol. 44, № 1. P. 1–19.
 384. Farrera C., Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process // *J. Immunol*. 2013. Vol. 191, № 5. P. 2647–2656.
 385. Yadav R., Momin A., Godugu C. DNase based therapeutic approaches for the treatment of NETosis related inflammatory diseases // *Int. Immunopharmacol*. 2023. Vol. 124, № Pt A.
 386. Vignarajah M. et al. Regulation of ICAM-1 in human neutrophils // *J. Leukoc. Biol*. 2024. Vol. 116, № 4. P. 901–908.
 387. Al Qutami F. et al. Characterizing the Inflammatory Profile of Neutrophil-Rich Triple-Negative Breast Cancer // *Cancers (Basel)*. 2024. Vol. 16, № 4. P. 747.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица S1. Межгрупповая и внутригрупповая вариация, а также значения стабильности экспрессии референсных генов, рассчитанные с использованием алгоритма NormFinder.

Ген	Вариация*	SD§	Стабильность†
<i>Tbp</i>	1.17	0.24	0.41
<i>Hprt1</i>	0.85	0.33	0.48
<i>Gapdh</i>	1.26	0.82	0.68
<i>Ywhaz</i>	1.77	0.51	0.72
<i>Actb</i>	1.46	0.70	0.78
<i>Eef2</i>	2.87	0.76	0.81
<i>Sdha</i>	2.22	0.73	0.81
<i>B2m</i>	2.50	0.94	0.84
<i>Rpl13a</i>	3.26	0.63	1.00
<i>Rack1</i>	3.10	1.11	1.06

Подгруппы разделены по источнику нейтрофилов (костный мозг или селезёнка), линии мышей (C57Bl или CBA) и опухолевой модели (без опухоли, LLC, RLS₄₀^{high}, RLS₄₀^{low}).

*Разница между группами

§ SD внутри группы

† Значение стабильности, которое объединяет как внутригрупповую, так и межгрупповую вариации. Гены перечислены в порядке убывания стабильности экспрессии — от наиболее стабильно-экспрессируемых сверху к менее стабильно-экспрессируемым внизу.

Таблица S2. Результаты анализа стабильности экспрессии референсных генов с использованием NormFinder.

Ген	Вариация*	SD§	Стабильность†
<i>Hprt1</i>	0.1	0.39	0.21
<i>Tbp</i>	0.51	0.26	0.36
<i>Sdha</i>	0.26	0.9	0.45
<i>B2m</i>	0.06	1.13	0.46
<i>Gapdh</i>	0.39	0.75	0.46
<i>Rack1</i>	0.29	1.28	0.53
<i>Eef2</i>	0.66	0.95	0.6
<i>Ywhaz</i>	0.85	0.6	0.6
<i>Actb</i>	0.84	0.68	0.61
<i>Rpl13a</i>	1.34	0.93	0.82

Группы разделены на образцы из здоровых мышей или мышей с опухолями.

*Разница между группами

§ SD внутри группы

† Значение стабильности, которое объединяет как внутригрупповую, так и межгрупповую вариации. Гены перечислены в порядке убывания стабильности экспрессии — от наиболее стабильно-экспрессируемых сверху к менее стабильно-экспрессируемым внизу

Таблица S3. Стабильность референсных генов, рассчитанная методом ΔC_t .

Ген	Среднее значение SDs значений ΔC_t †
<i>Tbp</i>	0.93
<i>Hprt1</i>	0.94
<i>Ywhaz</i>	1.09
<i>Gapdh</i>	1.09
<i>B2m</i>	1.11
<i>Actb</i>	1.11
<i>Sdha</i>	1.19
<i>Eef2</i>	1.26
<i>Rpl13a</i>	1.36
<i>Rack1</i>	1.45

† Гены перечислены в порядке убывания стабильности экспрессии — от наиболее стабильно-экспрессируемых сверху к менее стабильно-экспрессируемым внизу.

Таблица S4. Стабильность референсных генов, рассчитанная методом geNorm.

Ген	Значение $M^{\dagger}$
<i>Ywhaz/Tbp</i>	0.567
<i>Actb</i>	0.647
<i>Gapdh</i>	0.695
<i>Hprt1</i>	0.754
<i>B2m</i>	0.832
<i>Sdha</i>	0.922
<i>Eef2</i>	0.991
<i>Rpl13a</i>	1.080
<i>Rack1</i>	1.153

$\dagger$ Гены перечислены в порядке убывания стабильности экспрессии — от наиболее стабильно-экспрессируемых сверху к менее стабильно-экспрессируемым внизу.

Таблица S5. Матрица корреляции Пирсона для линеаризованных значений Ct (2^{-Ct}) исследуемых генов.

	<i>Actb</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Sdha</i>	<i>Ywhaz</i>	<i>Tbp</i>	<i>B2m</i>	<i>Eef2</i>	<i>Rpl13a</i>	<i>Rack1</i>
<i>Actb</i>	1.00	0.00	0.87	0.35	0.83	0.69	-0.03	0.13	-0.55	-0.53
<i>Hprt1</i>	0.00	1.00	0.16	0.37	0.22	0.34	0.39	0.31	0.58	-0.07
<i>Gapdh</i>	0.87	0.16	1.00	0.44	0.77	0.60	0.06	0.22	-0.35	-0.67
<i>Sdha</i>	0.35	0.37	0.44	1.00	0.56	0.59	0.47	0.86	0.09	-0.16
<i>Ywhaz</i>	0.83	0.22	0.77	0.56	1.00	0.87	-0.01	0.34	-0.43	-0.41
<i>Tbp</i>	0.69	0.34	0.60	0.59	0.87	1.00	0.12	0.50	-0.13	-0.15
<i>B2m</i>	-0.03	0.39	0.06	0.47	-0.01	0.12	1.00	0.36	0.35	-0.20
<i>Eef2</i>	0.13	0.31	0.22	0.86	0.34	0.50	0.36	1.00	0.37	0.10
<i>Rpl13a</i>	-0.55	0.58	-0.35	0.09	-0.43	-0.13	0.35	0.37	1.00	0.39
<i>Rack1</i>	-0.53	-0.07	-0.67	-0.16	-0.41	-0.15	-0.20	0.10	0.39	1.00

Таблица S6. Стабильность референсных генов, рассчитанная методом RefFinder.

Ген	Среднее геометрическое значений рангов [†]
<i>Tbp</i>	1.57
<i>Hprt1</i>	1.78
<i>Ywhaz</i>	3.20
<i>B2m</i>	3.66
<i>Gapdh</i>	4.23
<i>Actb</i>	4.56
<i>Sdha</i>	7.65
<i>Eef2</i>	8.00
<i>Rack1</i>	8.80
<i>Rpl13a</i>	9.00

[†] Гены перечислены в порядке убывания стабильности экспрессии — от наиболее стабильно-экспрессируемых сверху к менее стабильно-экспрессируемым внизу.

Таблица S7. Данные проточной цитофлуориметрии, отражающие % клеток, экспрессирующих CD40, FAS, ICAM-1, IFN γ R1 и PD-L1 (Ly6G⁺ события) в группе мышей с LLC (n=3).

	КМ	С	LLC
CD40	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.02	1.0 $\pm$ 0.1 ^{***, ###}
ICAM-1	0.4 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.03	2.00 $\pm$ 0.9
IFN γ R1	0.4 $\pm$ 0.02	0.1 $\pm$ 0.03 ^{***}	0.4 $\pm$ 0.01 ^{##}
FAS	0.7 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.02	0.7 $\pm$ 0.2
PD-L1	0.9 $\pm$ 0.01	0.6 $\pm$ 0.02	11.7 $\pm$ 0.8 ^{****, ####}

Результаты представлены как mean $\pm$ SEM. Данные статистически анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

* Статистические различия в сравнении с КМ;

Различия в сравнении с С;

одинарный символ $p \leq 0.05$; двойной символ $p \leq 0.01$; тройной символ $p \leq 0.001$; четвертной символ $p \leq 0.0001$.

Таблица S8. Данные RT-qPCR для нейтрофилов мышей с LLC (n=3).

	КМ	С	LLC
<i>Ccl17</i>	1.0±0.1	3.7±1.1	0.7±0.1 [#]
<i>Il10</i>	1.0±0.5	4.1±1.2	78.4±25.2 ^{*,#}
<i>Icam1</i>	1.0±0.2	0.3±0.1	26.6±17.0
<i>Tnfa</i>	1.1±0.2	1.5±0.2	1.3±0.5
<i>Cd274</i>	1.1±0.3	1.3±0.2	23.3±16.3
<i>Fas</i>	1.0±0.1	1.2±0.2	0.7±0.3
<i>Sirt1</i>	1.0±0.2	0.9±0.1	1.0±0.2
<i>Mmp9</i>	1.0±0.4	0.1±0.02	0.8±0.7
<i>Vegfa</i>	1.0±0.1	1.7±0.8	0.5±0.2

Данные обсчитывали с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$. В качестве контроля для всех генов использовали КМ. Результаты представлены как Mean±SEM. Уровень экспрессии генов нормализовали на уровень экспрессии *Tbp* и *Hprt1*. Данные статистически анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

* Статистические различия по сравнению с КМ;

Различия по сравнению с С;

одинарный символ $p \leq 0.05$.

Таблица S9. Данные проточной цитофлуориметрии, показывающие % клеток, экспрессирующих CD40, FAS, ICAM-1, IFN γ R1 и PD-L1 (Ly6G⁺ события) в подгруппах мышей с B16 (n=3).

	КМ	С	B16^{Low}	B16^{Low}/DNase	B16^{High}	B16^{High}/DNase
CD40	0.3±0.1	0.3±0.02	6.8±0.1 ^{****, ####, \$\$\$\$}	4.6±0.3 ^{****, ####, ††††}	0.8±0.1	1.4±0.01 ^{***, ###}
ICAM-1	0.4±0.1	0.5±0.03	5.4±0.04 ^{****, ####, \$\$\$\$}	4.1±0.3 ^{****, ####, ††††}	0.7±0.1	1.3±0.1 ^{**, #}
IFN γ R1	0.4±0.02	0.1±0.03	4.9±0.2 ^{****, ####, \$\$\$\$}	2.5±0.2 ^{****, ####, ††††}	0.2±0.01	0.6±0.1
FAS	0.7±0.1	0.5±0.02	2.1±0.02 ^{****, ####, \$\$\$\$}	5.3±0.2 ^{****, ####, ††††}	0.6±0.02	1.7±0.2 ^{***, ###, †††}
PD-L1	0.9±0.01	0.6±0.02 [*]	3.4±0.1 ^{****, ####}	3.2±0.04 ^{****, ####}	0.5±0.01 ^{**, \$\$\$\$}	0.9±0.1 ^{#, ††}

Результаты представлены как mean±SEM. Данные статистически анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

* Статистические различия по сравнению с КМ;

Различия по сравнению с С;

\$ Различия между группами (B16^{Low} vs B16^{High});

† Различия между одноименными группами, пролечившими инъекции физраствора и ДНКазы I;

одинарный символ $p \leq 0.05$; двойной символ $p \leq 0.01$; тройной символ $p \leq 0.001$; четвертной символ $p \leq 0.0001$.

Таблица S10. Данные RT-qPCR для нейтрофилов мышей с B16 (n=3).

	КМ	С	B16 ^{Low}	B16 ^{Low} /DNase	B16 ^{High}	B16 ^{High} /DNase
<i>Icam1</i>	1.1±0.3	1.0±0.5	0.2±0.01	0.5±0.1	1.5±0.6	1.8±0.5
<i>Tnfa</i>	1.0±0.1	0.6±0.2	0.2±0.01**	0.4±0.1	0.6±0.04	1.0±0.2
<i>Cd274</i>	1.0±0.1	0.9±0.5	0.5±0.02	0.5±0.04	1.0±0.03	2.7±1.2
<i>Fas</i>	1.0±0.1	0.3±0.1**	0.3±0.01**	0.4±0.1**	0.5±0.1*	0.6±0.1
<i>Sirt1</i>	1.0±0.1	0.4±0.2*	0.1±0.01**	0.3±0.1**	0.4±0.02*	0.7±0.1
<i>Hgf</i>	1.0±0.1	0.2±0.1****	0.5±0.01****	0.2±0.04****, †	0.2±0.01****, \$	0.3±0.1****
<i>Mmp9</i>	1.0±0.1	0.2±0.1*	0.1±0.01**	0.1±0.03**	0.3±0.1*	0.8±0.3
<i>Vegfa</i>	1.0±0.1	2.2±1.9	0.1±0.01	0.2±0.1	0.7±0.2	0.8±0.2
<i>Ern1</i>	1.1± 0.2	0.4±0.2	0.2±0.01*	0.4±0.1	0.7±0.02	1.0±0.3
<i>Stat3</i>	1.2±0.5	0.1±0.1	0.2±0.01	0.4±0.2	0.3±0.1	1.3±0.4

Данные обсчитывали с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$. В качестве контроля для всех генов использовали КМ. Результаты представлены как Mean±SEM. Уровень экспрессии генов нормализовали на уровень экспрессии *Tbp* и *Hprt1*. Данные статистически анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

* Статистические различия по сравнению с КМ;

Статистические различия по сравнению с С;

\$ Статистические различия между группами (B16^{Low} vs B16^{High});

† Различия между одноименными группами, получавшими инъекции физраствора и ДНКазы I;

одинарный символ $p \leq 0.05$; двойной символ $p \leq 0.01$; тройной символ $p \leq 0.001$; четвертной символ $p \leq 0.0001$.

Таблица S11. Данные проточной цитофлуориметрии, показывающие % клеток, экспрессирующих CD40, FAS, ICAM-1, IFN γ R1 и PD-L1 (Ly6G⁺ события) в подгруппах мышей с RLS₄₀ (n=3).

	KM	C	RLS ₄₀ ^{Low}	RLS ₄₀ ^{Low/D}	RLS ₄₀ ^{Med}	RLS ₄₀ ^{Med/D}	RLS ₄₀ ^{High}	RLS ₄₀ ^{High/D}
CD40	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.1 ± 0.01 ^{****, ####, §§§§}	2.3 ± 0.1 ^{****, #####}	2.4 ± 0.02 ^{****, #####, §§§§}	1.9 ± 0.3 ^{****, ####}	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.1
ICAM-1	0.5 ± 0.04	0.7 ± 0.03	0.8 ± 0.03	1.3 ± 0.2 [*]	1.5 ± 0.02 ^{** , #, Ψ, \$\$}	1.3 ± 0.4 [*]	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.03
IFN γ R1	0.2 ± 0.02	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.01	2.0 ± 0.4 ^{** , ##, ††}	2.3 ± 0.0 ^{***, ##, ΨΨ, \$\$\$}	1.6 ± 0.6 ^{*, #}	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01
FAS	0.3 ± 0.03	0.7 ± 0.1	20.6 ± 1.9 ^{** , ##, Ψ, §}	25.8 ± 8.9 ^{***, ###}	1.4 ± 0.1	5.6 ± 1.5	2.8 ± 0.3	1.9 ± 0.8
PD-L1	0.3 ± 0.05	0.4 ± 0.1	7.8 ± 0.02	20.0 ± 4.1 ^{****, #####, †††}	7.6 ± 0.2	14.4 ± 1.3 ^{***, ###}	2.3 ± 0.2	2.0 ± 0.3

Результаты представлены как mean±SEM. Данные статистически анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

* Статистические различия в сравнении с KM;

Различия в сравнении с C;

§ Различия между подгруппами (RLS₄₀^{Low} vs RLS₄₀^{High});

Ψ Различия между подгруппами (RLS₄₀^{Low} vs RLS₄₀^{Med});

\$ Различия между подгруппами (RLS₄₀^{Med} vs RLS₄₀^{High});

† Различия между одноименными подгруппами, получавшие инъекции физраствора и ДНКазы I;
одинарный символ $p \leq 0.05$; двойной символ $p \leq 0.01$; тройной символ $p \leq 0.001$; четвертной символ $p \leq 0.0001$.

Таблица S12. Данные RT-qPCR для нейтрофилов подгрупп мышей с RLS₄₀ (n=3).

	KM	C	RLS ₄₀ ^{Low}	RLS ₄₀ ^{Low/D}	RLS ₄₀ ^{Med}	RLS ₄₀ ^{Med/D}	RLS ₄₀ ^{High}	RLS ₄₀ ^{High/D}
<i>Ccl17</i>	1.0±0.01	1.9±0.4	2.1±0.3	2.3±0.9	1.6±0.1	3.2±0.6	9.0±4.4*	1.4±0.2
<i>Il10</i>	-	1.0±0.2	4.1±0.9 ^{##, §}	1.6±0.2 [†]	4.2±0.01 ^{##, \$\$}	1.5±0.3 ^{††}	1.6±0.4	0.8±0.6
<i>Icam1</i>	1.0±0.1	3.8±2.5	9.9±2.1*	15.2±2.8 ^{***, ##}	4.1±0.1	48.1±0.6 ^{****, ####, ††††}	5.0±1.8 ^{***}	1.4±0.5
<i>Tnfa</i>	1.0±0.1	1.2±0.3	2.4±1.3	2.2±1.1	1.6±0.03	3.5±0.1	1.5±0.8	1.3±0.3
<i>Cd274</i>	1.0±0.2	4.4±0.5	25.0±4.3*	81.8±12.5 ^{****, ####, ††††}	23.7±1.2	37.7±1.3 ^{**, ##}	11.4±1.9	7.5±2.7
<i>Fas</i>	1.0±0.01	1.4±0.3	1.3±0.23	1.4±0.4	2.4±0.2 ^{**, Ψ, \$}	2.7±0.2 ^{***, #}	1.3±0.3	1.3±0.2
<i>Sirt1</i>	1.0±0.04	1.3±0.2	1.2±0.1	2.0±0.4	1.5±0.1	2.1±0.1	1.1±0.3	0.9±0.3
<i>Hgf</i>	1.1±0.2	0.5±0.1	0.4±0.3	1.1±0.5	0.6±0.01	1.4±0.4	0.7±0.1	0.6±0.2
<i>Mmp9</i>	1.0±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.8±0.4	0.2±0.02*	2.00±0.1 ^{**, ####, ††††}	0.3±0.1	0.2±0.1*
<i>Vegfa</i>	1.0±0.1	1.9±0.2	1.2±0.6	1.9±0.5	1.9±0.1	3.3±0.1 ^{**}	1.5±0.3	1.4±0.1
<i>Vegfr1</i>	1.0±0.2	5.9±0.1	7.2±2.1	6.1±2.9	7.1±0.5	12.9±5.0*	2.6±0.6	4.2±0.8
<i>Ern1</i>	1.2±0.4	0.9±0.2	2.1±0.8	12.3±6.8	4.9±1.8	10.8±5.9	1.5±0.2	0.8±0.4
<i>Stat3</i>	1.1±0.3	0.5±0.1	0.7±0.5	8.1±4.4	0.7±0.1	5.5±3.0	0.7±0.2	0.6±0.03

Данные обсчитывали с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$. В качестве контроля для всех генов использовали KM за исключением *Il10*, для которого в качестве контроля использовали C. Результаты представлены как Mean±SEM. Уровень экспрессии генов нормализовали на уровень экспрессии *Tbp* и *Hprt1*. Данные статистически анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

* Статистические различия по сравнению с KM;

Различия по сравнению с C;

§ Различия между группами (RLS₄₀^{Low} vs RLS₄₀^{High});

Ψ Различия между группами (RLS₄₀^{Low} vs RLS₄₀^{Med});

\$ Различия между группами (RLS₄₀^{Med} vs RLS₄₀^{High});

† Различия между одноименными группами, получавшими инъекции физраствора и ДНКазы I;

одинарный символ $p \leq 0.05$; двойной символ $p \leq 0.01$; тройной символ $p \leq 0.001$; четвертной символ $p \leq 0.0001$.

Таблица S13. Распределение мышей с RLS₄₀ в подгруппах, получавших инъекции физраствора (контроль) и ДНКазы I.

	Физраствор	ДНКазы I
RLS ₄₀ ^{High} (%/n)	(60.6 ± 1.7)/12	(44.5 ± 3.3)**/9
RLS ₄₀ ^{Med} (%/n)	(14.1 ± 13.4)/3	(25.5 ± 7.3)/5
RLS ₄₀ ^{Low} (%/n)	(25.3 ± 12.1)/5	(30.0 ± 4.0)6

Данные анализировали с использованием t теста. ** $p < 0.01$.

Таблица S14. Процентное содержание нейтрофилов в селезенке мышей-опухоленосителей.

Group	Neutrophil, %
Здоровые CBA	1.0±0.1
RLS ₄₀ ^{Low}	1.9±0.2
RLS ₄₀ ^{Med}	2.8±0.1
RLS ₄₀ ^{High}	4.0±0.3
RLS ₄₀ ^{Low} /DNase	2.6±0.1
RLS ₄₀ ^{Med} /DNase	2.2±0.1
RLS ₄₀ ^{High} /DNase	3.3±0.8

Данные представлены как mean ± SD.

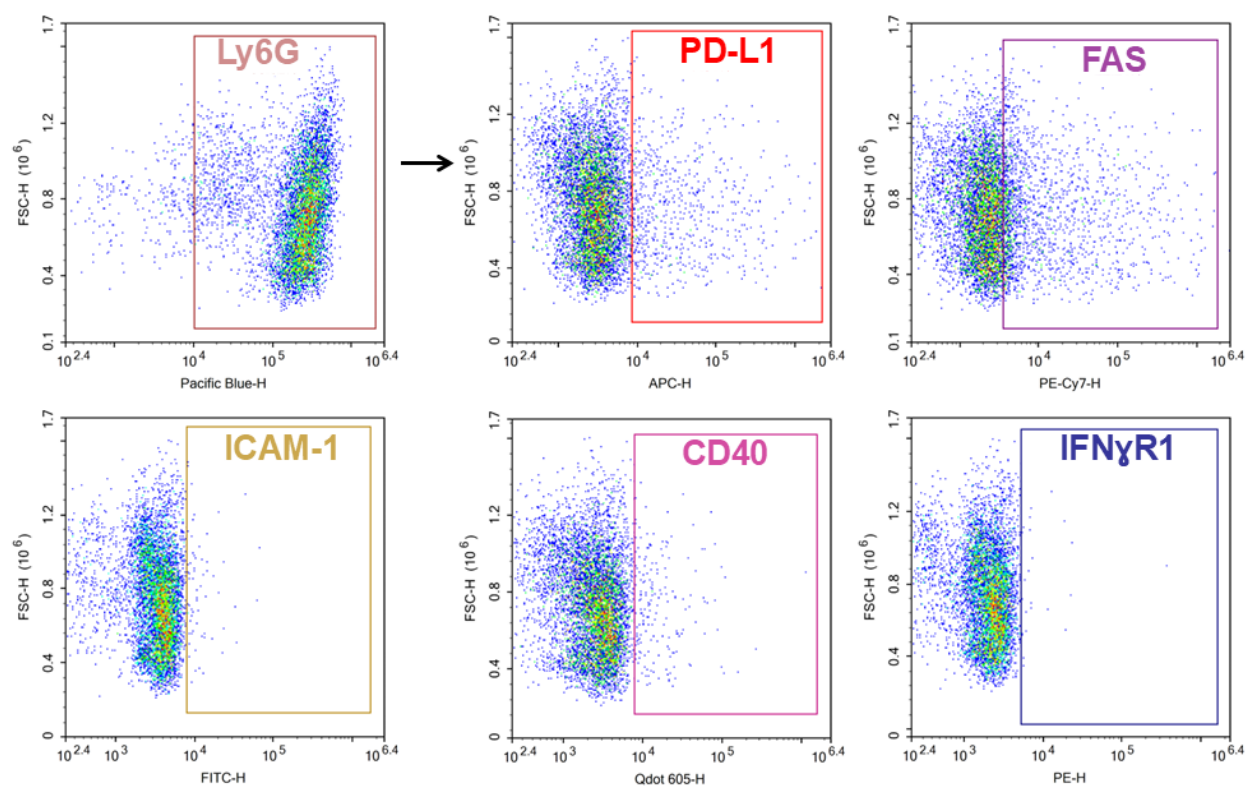


Рисунок S1. Характеризация нейтрофилов селезенки. Гейтирование нейтрофилов проводили по маркеру Ly6G⁺ и анализировали процент нейтрофилов, экспрессирующих PD-L1, FAS, ICAM-1, CD40 и IFN γ R1.

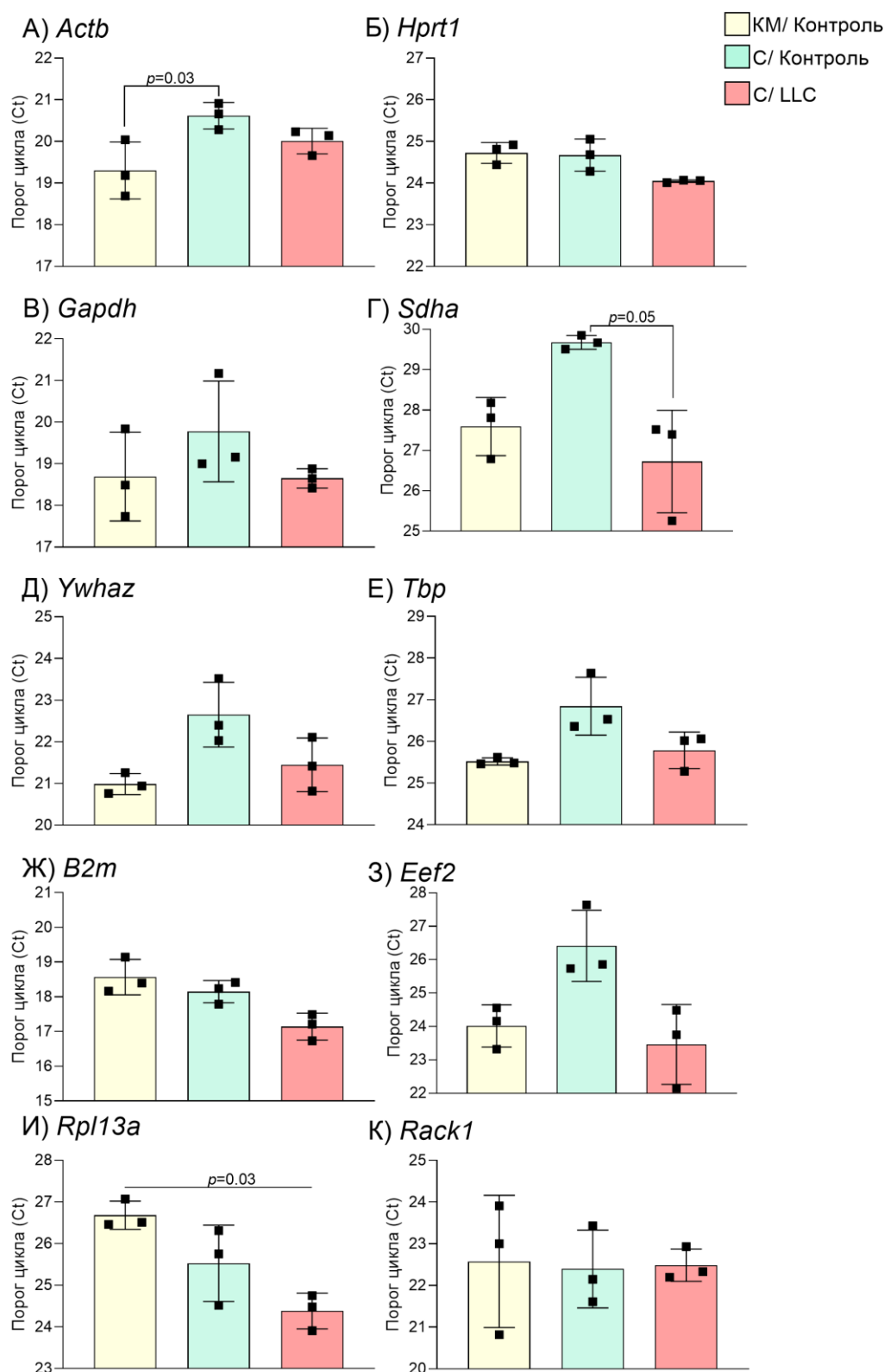


Рисунок S2. Значения Ct референсных генов в нейтрофилах, выделенных из селезенок мышей с LLC, по сравнению с нейтрофилами из костного мозга (KM) и селезенки соответствующих здоровых мышей (C57Bl/6). Данные представлены в виде $\text{mean} \pm \text{SD}$. Для анализа использовались критерий Краскела–Уоллиса с последующим тестом Данна для множественных сравнений.

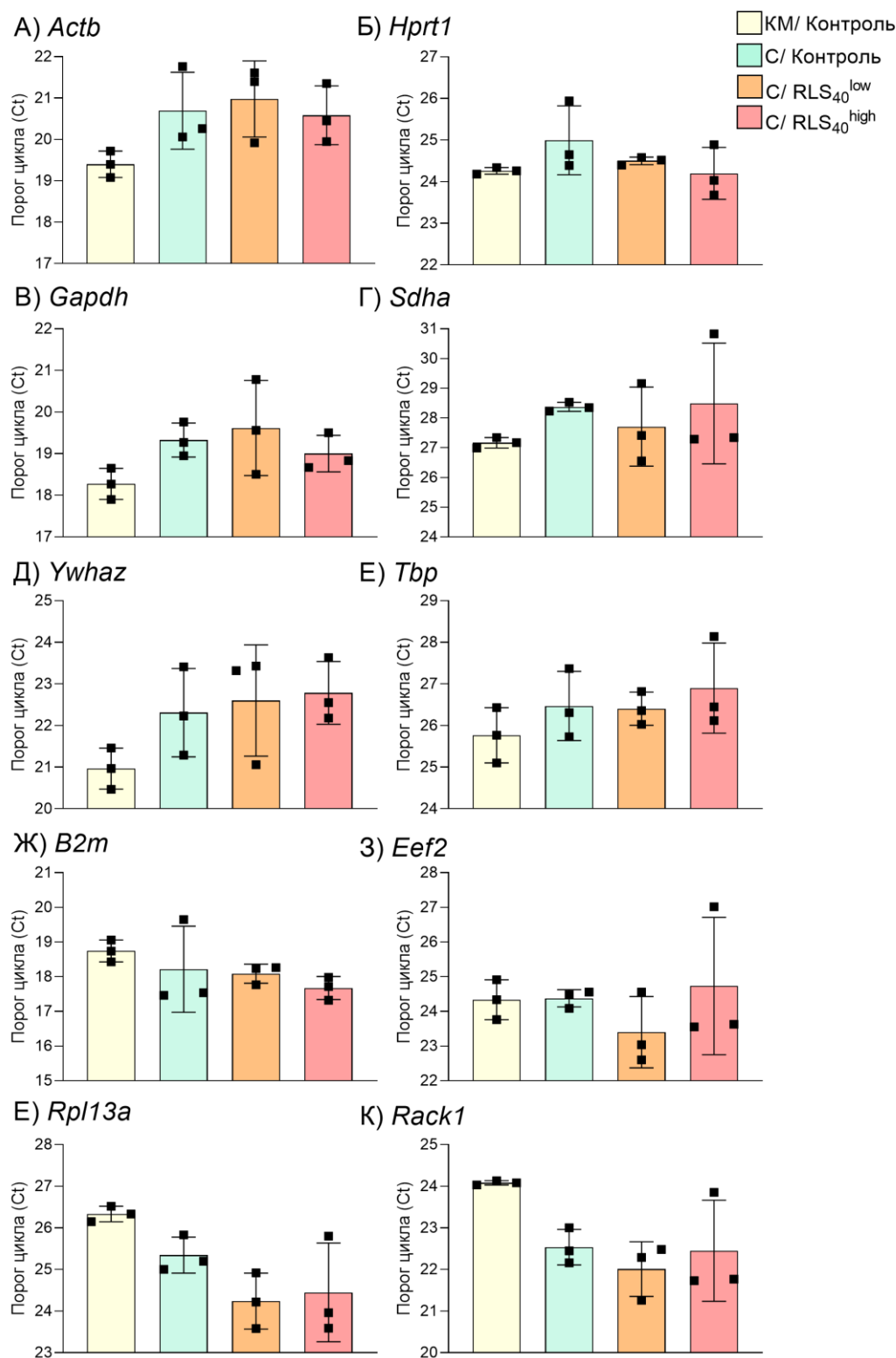


Рисунок S3. Значения Ct референсных генов в нейтрофилах, выделенных из селезенок мышей с RLS₄₀, по сравнению с нейтрофилами из костного мозга (KM) и селезенки соответствующих здоровых мышей (CBA). Данные представлены в виде mean±SD. Для анализа использовали критерий Краскела–Уоллиса с последующим тестом Данна для множественных сравнений. Статистически значимых различий ($p < 0.05$) не выявлено. RLS₄₀^{Low} – RLS₄₀ с опухолевым узлом размером менее 0.1 см³, RLS₄₀^{High} – RLS₄₀ с опухолевым узлом размером более 1 см³.

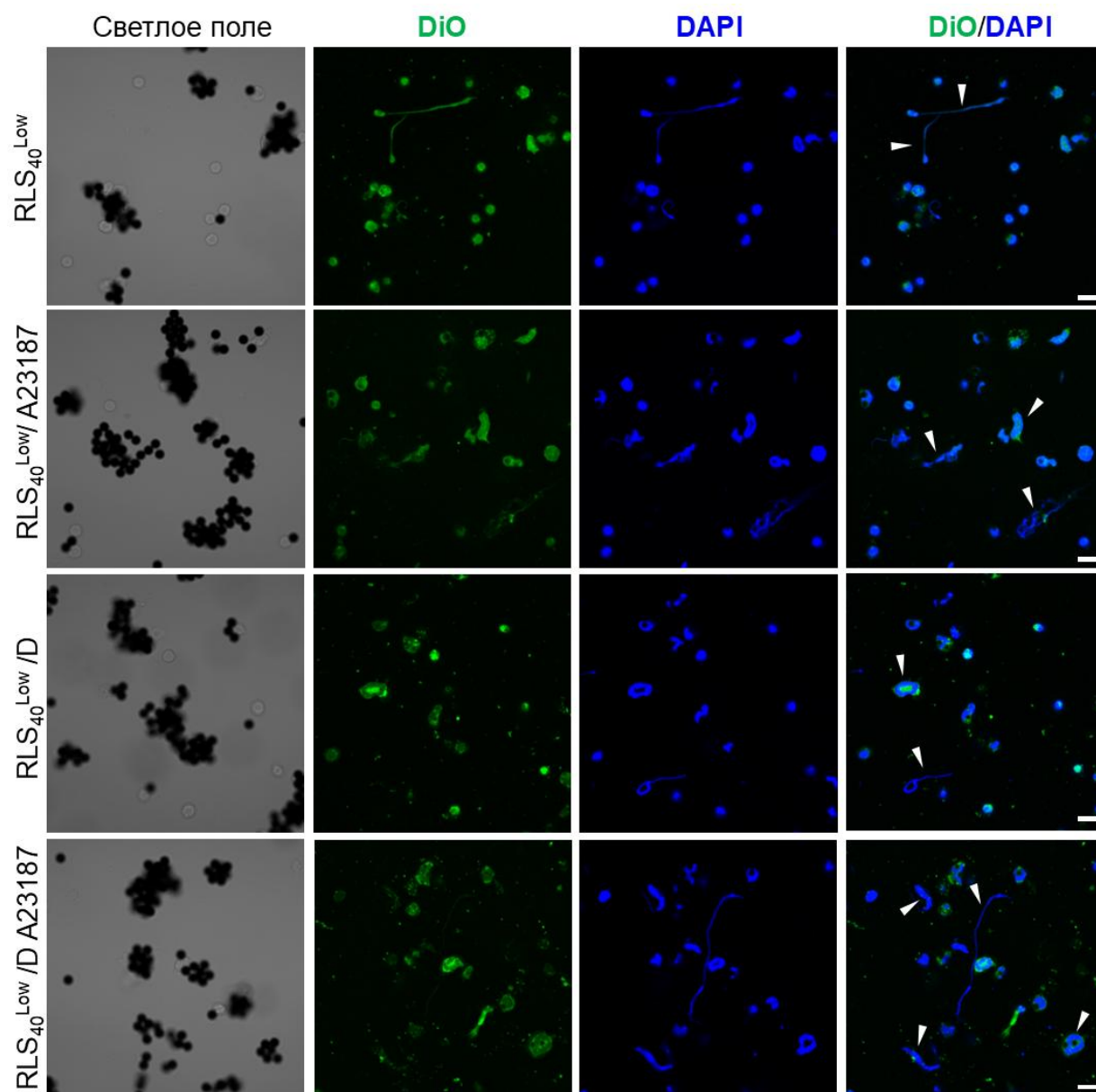


Рисунок S4. Образование NET нейтрофилами подгрупп RLS_{40}^{Low} и $RLS_{40}^{Low/D}$ в отсутствие и присутствии A23187. Данные конфокальной флуоресцентной микроскопии. Масштабная линейка 10 мкм. Белые стрелки указывают на NET. RLS_{40}^{Low} – нейтрофилы селезенки мышей с RLS_{40} с опухолевым узлом размером менее 0.1 см^3 , $RLS_{40}^{Low/D}$ – мыши, получавшие ДНКазу I.