

УДК 571.27

Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NET): перспективы таргетной терапии

Д. В. Волков¹, Г. В. Тец², Ю. П. Рубцов¹, А. В. Степанов^{1*}, А. Г. Габибов¹¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022 Россия

*E-mail: stepanov.aleksei.v@gmail.com

Поступила в редакцию 29.06.2021

Принята к печати 06.09.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11503

РЕФЕРАТ Противоопухолевая терапия, в том числе адоптивная иммунотерапия, неизбежно сталкивается с мощным противодействием со стороны прогрессирующей опухоли. Если гематологические злокачественные новообразования к настоящему моменту поддаются терапии с помощью CAR-T-лимфоцитов (T-cells, modified by chimeric antigen receptor), то солидные опухоли значительно более устойчивы к этому виду терапии. Согласно последним исследованиям, ведущая роль в ускользании солидных опухолей от цитотоксической активности иммунных клеток принадлежит опухолевому микроокружению, в состав которого входят несколько типов клеток, в том числе нейтрофилы, самые многочисленные клетки иммунной системы. Установлено, что на развитие опухоли и ее способность к метастазированию прямо влияют внеклеточные ловушки нейтрофилов (neutrophil extracellular traps, NET), образующиеся в результате ответа на опухолевые стимулы. Кроме того, ядерная ДНК нейтрофилов – главный компонент NET – создает пространственную преграду для взаимодействия CAR-T с опухолевыми клетками. В этой связи для повышения эффективности действия CAR-T путем снижения влияния NET крайне перспективным представляется использование эукариотической ДНКазы I. Нами рассмотрена роль NET в опухолевом микроокружении и различные подходы к снижению влияния NET на опухоль.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА онкологические заболевания, микроокружение опухоли, нейтрофилы, нетоз.

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные солидные опухоли образуют, в отличие от гематологических, замкнутую структуру, состоящую из нескольких слоев. Злокачественные клетки, находящиеся в центре опухоли и несущие на поверхности рецепторы адгезии, соединены между собой туннельными контактами и взаимодействуют друг с другом с помощью аутокринных и паракринных сигналов, передаваемых с помощью растворимых факторов и внеклеточного матрикса. Ближе к периферии опухоли расположен слой, формирующий другую нишу, в состав которой входят сосуды, опухоль-ассоциированные фибробласты и стромальные клетки, получающие сигналы через рецепторы адгезии и растворимые факторы. Еще дальше от центра опухоли находится замыкающий слой, куда доходят сигналы стимуляции или ингибирования от опухолевых клеток. Этот слой включает новообразованные сосуды, внутриопухолевые лимфатические узлы, иммунные клетки, опухоль-ассоциированные фибробласты, внеклеточный матрикс и нервные окончания. Самым наружным считается

проксимальный по отношению к нормальной ткани слой, где располагаются лимфатические и кровеносные сосуды, иммунные клетки и проксимальные лимфоидные элементы. К дополнительным уровням организации клеток, которые влияют на развитие опухоли, относятся метастатические очаги. Границей опухолевого микроокружения принято считать так называемый замыкающий слой. Сложная морфологическая структура опухолевого новообразования требует разработки таргетной терапии, основанной на понимании механизмов проникновения терапевтических агентов непосредственно к трансформированным клеткам [1–5].

Значительную часть опухолевого микроокружения (tumor microenvironment, TME) составляют иммунные клетки хозяина, среди которых наиболее многочисленной группой являются нейтрофилы. Воспалительные процессы возникают в области опухолевого роста, а сигналы, выделяемые опухолевыми и опухоль-ассоциированными клетками, привлекают нейтрофилы, которые превращаются в опухоль-ассоциированные нейтрофилы (tumor-associated

neutrophils, TAN). Они принадлежат к супрессорным клеткам миелоидного ряда (myeloid derived suppressor cells, MDSC). MDSC возникают не только в опухолях, но при онкологических заболеваниях именно они препятствуют развитию полноценной защитной противоопухолевой реакции. TAN получают, в том числе и сигналы гибели (суицида), что провоцирует специфический для них вид клеточной смерти, сопровождающийся высвобождением большого количества геномной ДНК, связанных с ней белков и ферментов, которые образуют NET. Состав NET варьирует в зависимости от типа начального стимула/комбинации стимулов. Неизменной частью NET является сетка хромосомной ДНК. Это привело к мысли о том, что для эффективного разрушения NET можно применять ДНКазы. Действительно, последние исследования показывают, что введение ДНКазы I экспериментальным мышам замедляет рост первичной опухоли, ингибирует метастатический потенциал опухолевых клеток и увеличивает продолжительность жизни животных. Многообещающие результаты, полученные при введении очищенной ДНКазы I мышам, стимулировали создание новых способов доставки ДНКазы I в организм.

ОБРАЗОВАНИЕ NET И ИХ СОСТАВ

Внеклеточные ловушки нейтрофилов были открыты как один из защитных механизмов действия нейтрофилов при бактериальных инфекциях [6]. Выбрасываемые NET задерживают распространение и убивают патогенных микробов в кровотоке [6, 7]. Позднее NET обнаружили и в биоптатах опухолей различного типа. При этом наличие NET коррелировало с неблагоприятным прогнозом [8–11]. Это открытие привело к интенсивному исследованию роли NET в онкогенезе.

В наиболее изученном пути, ведущем к выбросу NET (рис. 1), передача сигналов киназой, регулируемой внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinase, ERK), приводит к активации NADPH-оксидазы (NADPH oxidase, NOX) (рис. 1, I) и продукции супероксидных радикалов, которые превращаются в пероксид водорода с помощью супероксиддисмутазы (рис. 1, II) [12]. Миелопероксидаза (MPO) превращает пероксид водорода в хлорноватистую кислоту, активируя эластазу нейтрофилов (neutrophil elastase, NE) (рис. 1, II). NE отвечает за деградацию цитоскелета и ядерной мембраны, позволяя ядерному содержимому смешаться с цитоплазмой (рис. 1, II) [13]. Превращение остатков аргинина в составе гистонов в цитруллины (цитруллинизация), катализируемое активированной белок-аргининдезиминой (protein arginine deiminase, PAD), и протеолитическое расщепление MPO и NE

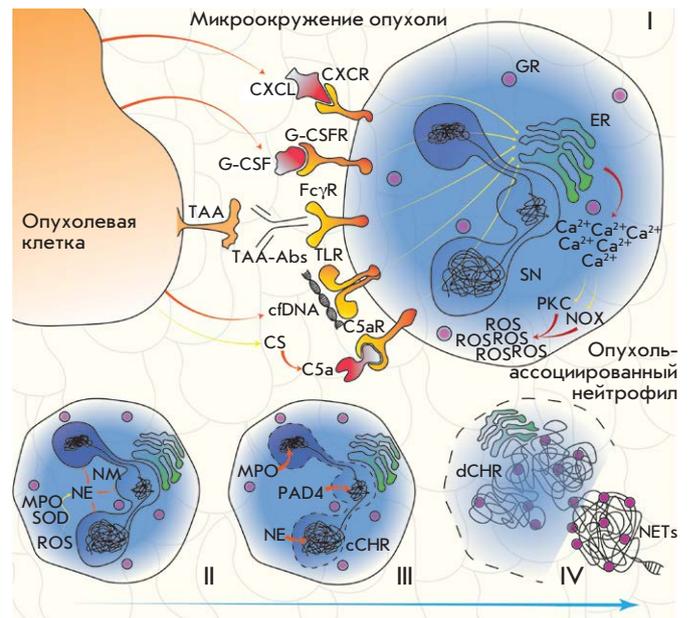


Рис. 1. Сигнальный путь NOX-зависимого нетоза. Различные стимулы, связанные с опухолью, вызывают повышение цитоплазматической концентрации Ca^{2+} в TAN, что служит для активации PKC и NOX и приводит к внутриклеточной продукции ROS (I). При воздействии SOD и MPO ROS превращаются в HClO и активируется NE (II). NE способствует деградации NM, а затем PAD4, MPO и NE обеспечивают деконденсацию хроматина и его смешивание с цитоплазматическими гранулами (III), а затем полученная смесь в виде NET выбрасывается во внеклеточное пространство во время нетоза (IV). Сокращения: TAA – опухолю-ассоциированный антиген, cDNA – внеклеточная ДНК, TAA-Abs – антитела против TAA, FcγR – рецептор константного фрагмента IgG, TLR – Toll-подобный рецептор, CXCL – цитокин семейства CXС, CXCR – рецептор CXCL, ER – эндоплазматический ретикулум, GR – гранула, G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, G-CSFR – рецептор G-CSF, CS – система комплемента, C5a – компонент комплемента 5a, C5aR – рецептор C5a, SN – сегментированное ядро, NM – ядерная мембрана, NE – эластаза нейтрофилов, MPO – миелопероксидаза, SOD – супероксиддисмутаза, ROS – активные формы кислорода, PKC – протеинкиназа C, NOX – NADPH-оксидаза, cCHR – конденсированный хроматин, PAD4 – белок-аргининдезиминаза 4, dCHR – деконденсированный хроматин, NET – внеклеточные ловушки нейтрофилов

приводят к деконденсации хроматина (рис. 1, III) [14]. Волокна хроматина связываются с гранулами и цитоплазматическими белками, а затем выбрасываются из клетки (рис. 1, IV).

Производство активных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS) – ключевое событие не-

тоза (рис. 1, I). Дыхательная цепь митохондрий и NOX независимо вносят вклад в образование ROS. Несколько различных рецепторов запускают образование NET, активируя NOX, при классическом «суицидальном» нетозе [15] (рис. 1, I). Точно так же форбол-12-миристан-13-ацетат (PMA), имитируя диацилглицерин, активирует протеинкиназу C (PKC) [16] и передачу сигналов ERK, что аналогично индукции NET патогенными бактериями и грибами. Примечательно, что варианты применения PMA для индукции нетоза у нейтрофилов в культуре могут существенно различаться [17].

NOX-независимый путь нетоза основан на продукции ROS митохондриями, чему способствуют щелочные значения pH, которые увеличивают приток Ca^{2+} [18]. Ca^{2+} в свою очередь активирует один из типов калиевых каналов малой проводимости SK3 (small conductance calcium-activated potassium channels, SK), что критично для NOX-независимого нетоза [19]. Активация PAD4 и цитруллинирование гистонов ярко выражены при NOX-независимом нетозе. Ионифоры кальция, такие, как иономицин и A23187 (Calcimycin), активируют PKC- ζ и затем PAD4 [16], что вызывает NOX-независимый нетоз. В некоторых условиях NOX-независимое высвобождение ядерной и митохондриальной ДНК происходит из живых нейтрофилов. Показано, что рибонуклеопротеидные иммунные комплексы, действуя на нормальные нейтрофилы или иммуносупрессорные нейтрофилы низкой плотности, индуцируют выработку митохондриальных ROS и выделение NET, содержащих митохондриальную ДНК, из живых клеток [20]. При сепсисе активированные тромбоциты прикрепляются к нейтрофилам и вызывают экструзию NET из живых клеток [21].

Несмотря на различную роль продукции ROS и активности ферментов в индукции нетоза, различные пути активации приводят к образованию NET, наделенных сходной бактерицидной активностью [22].

Помимо ионифоров и PMA существует еще более 10 веществ-индукторов нетоза, которые можно использовать *in vitro* для анализа данного процесса [10]. Протеомный анализ индуцированных различными стимулами NET обнаружил в их составе 330 белков, 74 присутствовали вне зависимости от способа индукции нетоза, представляя пул обязательных компонентов, который характеризует NET любого типа [23, 24].

РОЛЬ NET В ОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССАХ

Данные о связи NET с развитием рака стимулировали интенсивное изучение функций этих структур в разных типах опухолей. Вскоре появились сообщения о прямом влиянии NET на пролиферацию опу-

холевых клеток через протеазы или активирующие сигналы [25–28].

Опухолевые клетки – одна из причин нетоза

Показано, что опухолевые клетки способны индуцировать нетоз *in vivo* и *in vitro* [11], а также выявлена связь TAN с образованием NET [11, 29–31]. К примеру, *in vitro* установлено, что линия клеток рака поджелудочной железы (AsPC-1) индуцирует образование NET [32], и основная роль в нетозе приписывается внеклеточным белкам этой линии. В той же работе показано, что NET усиливают эндогенный тромбиновый потенциал нормальной плазмы и индуцируют миграцию, инвазию и ангиогенез раковых клеток [32]. Внеклеточные РНК карциномы легких Льюиса вызывают образование NET, согласно данным другого исследования *in vitro* [33].

Нейтрофилы мышей с хроническим миелолейкозом, раком молочной железы и легких более склонны к нетозу, чем нейтрофилы здоровых животных. Высокая склонность нейтрофилов к образованию NET при этих патологиях коррелирует с системным действием опухолей на организм [34, 35].

Рекрутирование нейтрофилов кондиционированной средой от гипоксических раковых клеток наблюдали *in vitro*. Миграция клеток была опосредована высокими уровнями хемокинов и HMGB1, также способных генерировать NET в TME [31]. Недавно Tohme и соавт. [31] показали, что NET способствуют росту опухолевых клеток за счет усиления их митохондриальных функций. Более того, имплантированные под кожу контрольных мышей опухоли росли быстрее, чем у животных с нокаутом гена PAD4 (PAD4-KO). Число метастазов в печени мышей с дефицитом PAD4 было меньше, чем у животных контрольной группы. Внутривентриальное введение рекомбинантной ДНКазы I мышам без нокаута PAD4 также приводило к снижению числа метастазов. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов опухолей PAD4-KO выявило очень низкую инфильтрацию нейтрофилов по сравнению с контролем. В целом, эти данные подчеркивают центральную роль рекрутирования нейтрофилов и образования NET в росте и прогрессии опухоли. Park и соавт. [11] также обнаружили тесную связь между метастатическими опухолевыми клетками, привлечением нейтрофилов и образованием NET. Установлено, что метастатические клетки рака молочной железы провоцируют нетоз, который поддерживает метастазы за счет NET. Цитокин CXCL1 опосредует рекрутирование нейтрофилов в опухоли мышей, которым ортотопически подсаживали клетки рака молочной железы – 4T1 (образуют метастазы) и 4T07 (не образуют метастазы). В первичных опухолях 4T1 обнаружено больше

нейтрофилов, чем в 4T07. Уменьшение же CXCL1 в клетках 4T1 снизило инфильтрацию опухоли нейтрофилами. Путем иммунофлуоресцентного окрашивания срезов ткани легкого показано, что образование NET происходит сразу после инъекции клеток 4T1 в хвостовую вену. Более того, метастатические клетки выделяли гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), который вызывал вокруг них нетоз, а антитела, блокирующие G-CSF, сильно снижали образование NET [11].

NET вовлечены в нарушение кровообращения

У трансгенных мышей линий RIP1-Tag2 (спонтанная инсулинома) и MMTV-PyMT (рак молочной железы) обнаружены изменения кровеносных сосудов и усиленная инфильтрация нейтрофилов в сердце и почках, напоминающие системные повреждения у онкологических больных. Кроме того, в почках таких животных обнаружены тромбоцитарно-нейтрофильные комплексы, свидетельствующие о формировании NET. Причем эти комплексы отсутствовали у всех проанализированных здоровых мышей [36]. Ранее показали, что тромбоциты побуждают нейтрофилы высвобождать NET, тем самым способствуя уничтожению бактерий [21]. Olsson и соавт. выяснили, что накопление NET в сосудах связано с активацией провоспалительных молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина, а также провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-6 и хемокина CXCL1. Введение ДНКазы I для разрушения NET восстановило перфузию в почках и сердце до уровня у здоровых мышей, а также предотвратило закупорку кровеносной сети этих органов. Результаты исследования убедительно свидетельствуют о том, что NET опосредуют негативные побочные эффекты опухолей на дистальные органы, нарушая в них функцию сосудов и усиливая воспаление [36].

NET и тромбоциты играют ключевую роль в гиперкоагуляции крови при раке поджелудочной железы (pancreatic adenocarcinoma, PA), что приводит к повышенному риску венозной тромбоэмболии и тромбоза, ассоциированного с раком, в ортотопической модели PA у мышей C57BL/6 и у пациентов [37]. Berger-Achituv и соавт. [8] обнаружили TAN в диагностических биопсиях детей с саркомой Юинга. В двух образцах NET продуцировались за счет TAN. Метастазы и ранний рецидив после высоких доз химиотерапии, наблюдаемые у этих пациентов, указывают на возможную роль NET в прогрессировании саркомы Юинга [8]. Важную роль NET при онкологических заболеваниях подчеркивает также их связь с изменением свертывания крови у пациентов с опухолями. NET стимулируют

тромбоз, связанный с раком, – симптом, который сопутствует очень плохому прогнозу [26, 38]. Уровни циркулирующих NET измеряли и у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК), оценивая уровень соответствующих маркеров (комплексов ДНК-гистоны, двухцепочечной ДНК, NE). Аналогичным образом измеряли содержание маркеров активации контактной фазы (фактор XIIa и высокомолекулярный кининоген). NET и маркеры активации контактной фазы у пациентов с ГЦК были выше, чем у здоровых доноров [39]. Обнаружена корреляция между высокими уровнями маркеров NET и гиперкоагуляцией у пациентов со злокачественными образованиями поджелудочной железы [32]. Более того, на поздних стадиях заболевания уровни цитруллинированного гистона H3 (histone H3 citrullinated, H3-cit) в плазме пациентов были выше, чем у здоровых доноров, а в нейтрофилах было повышено содержание H3-cit. Кроме того, уровень H3-cit в плазме онкологических больных действительно коррелирует с уровнями NE, MPO, интерлейкинов-6 и -8 – активаторов нетоза [40, 41].

Повышенное содержание NET коррелирует с наличием опухолевого процесса

Спонтанная неоплазия кишечника у мышей коррелирует с накоплением иммуносупрессорных проонкогенных нейтрофилов низкой плотности с фенотипом N2, активацией рецептора комплемента C3a и образованием NET [42].

Обнаружена положительная корреляция между повышенным уровнем NET в плазме и различными опухолевыми процессами, например, NET найдены в тканях легких, периферической крови и мокроте пациентов с раком легкого [33]. У пациентов с колоректальным раком уровни NET, продуцируемых нейтрофилами после стимуляции *in vitro*, были значительно выше, чем в контрольной группе, и были связаны с плохим клиническим исходом [10]. NET выявлены при раке молочной железы, а также в метастатических поражениях легкого, причем наиболее высоким их содержание (%) было у пациентов с трижды негативным раком молочной железы [11]. Обнаружено также увеличение количества TAN и NET в гистопатологических образцах метастазов в печень пациентов с колоректальным раком [41] по сравнению с тканью печени здоровых доноров. Кроме того, высокие уровни цитруллинированных гистонов в опухолях указывают на нетоз. Предоперационные уровни MPO-ДНК, надежного маркера системного нетоза [41], в сыворотке пациентов были выше, чем у здоровых индивидов, и ассоциировались с неудовлетворительным прогнозом. Таким образом, уровни MPO-ДНК в сыворотке мож-

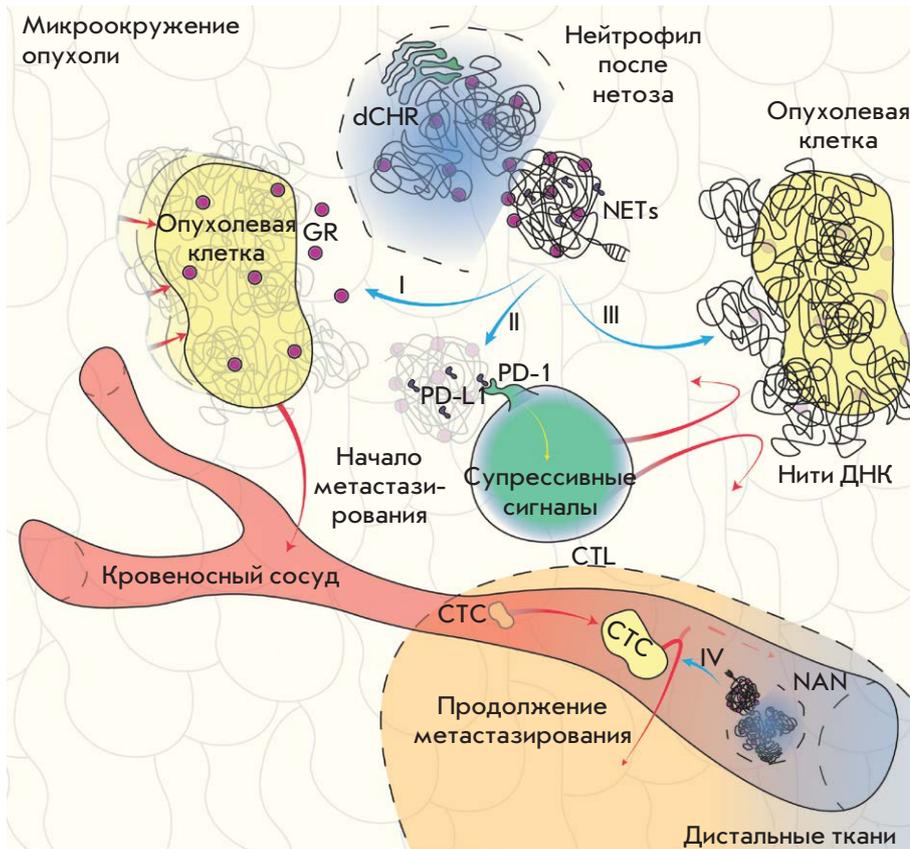


Рис. 2. Комплексное влияние NET на опухолевые клетки и компоненты TME. Гранулы NET содержат ферменты, которые активируют опухолевые клетки, меняя их фенотип на метастатический (I); NET, а также супрессорные молекулы (PD-L1), которые, взаимодействуя с цитотоксическими клетками, вызывают супрессию их активности (II); нити ДНК, основной компонент NET, окутывают опухолевые клетки, создавая стерическое препятствие для взаимодействия с цитотоксическими клетками (III); опухолевые клетки выходят из микроокружения в кровеносные сосуды, и в дистальных тканях за счет NET происходит захват этих циркулирующих клеток, что поддерживает метастазирование (IV). dCHR – деконденсированный хроматин, NET – внеклеточные ловушки нейтрофилов, GR – гранула, PD-L1 – лиганд программируемой гибели 1, PD-1 – рецептор PD-L1, CTL – цитотоксическая клетка, CTC – циркулирующая опухолевая клетка, NAN – нейтрофил после нетоза

но рассматривать как возможный прогностический маркер [31].

NET и опухолевые клетки прикрепляются друг к другу

Помимо локальных опухолевых и системных эффектов, NET могут способствовать метастазированию, захватывая циркулирующие опухолевые клетки (circulating tumor cells, CTC) (рис. 2, IV) [43]. У мышей с внутрибрюшинным сепсисом, имитирующих послеоперационное воспаление, наблюдали адгезию раковых клеток к NET и усиленную экспрессию интегрина бета-1 как в опухолевых клетках, так и в NET, что, по-видимому, можно считать ключевым фактором адгезии CTC к NET. Обработка ДНКазой I нарушала данный процесс [44]. В мышинных моделях нетоз и захват CTC легких вызвали микрометастазы в печень [45]. Наконец, NET способствовали развитию и прогрессии метастазов в печень после хирургического вмешательства [41]. Показана способность различных линий раковых клеток (HT1080, U-87MG, H1975, DU 145, PC-3 и A-431) прикрепляться *in vitro* к NET, полученным из нейтрофил-подобных клеток, через поверхностные интегринны $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ [46].

Избыток циклического пептида RGD ингибировал адгезию опухолевых клеток к NET до уровня, наблюдаемого при гидролизе NET ДНКазой I.

NET провоцируют метастазирование

Помимо всех ранее описанных функций, NET «пробуждают» спящие опухолевые клетки (рис. 2, I). Недавно установили участие NET в рецидивировании опухоли [47]. Хроническое воспаление легких, вызванное табачным дымом или назальным введением липополисахарида – активатора нетоза, способствовало активации спящих опухолевых клеток и формированию метастазов. NET связывались с внеклеточным матриксом и провоцировали расщепление и ремоделирование ламинина с образованием нового поверхностного эпитопа, который инициировал пролиферацию покоящихся клеток, посредством активации интегрина и передачи сигналов через киназы FAK / ERK / MLCK / YAP. При этом разрушение NET ДНКазой I *in vitro* и *in vivo* подавляло метастазирование. Оценена способность изолированных NET изменять фенотип клеток рака молочной железы человека на прометастатический [47]. NET изменяют типичную морфологию клеток MCF7 с эпи-

телиальной на мезенхимальную, при которой усиливаются миграционные свойства опухоли с такими типичными признаками эпителиально-мезенхимального перехода (epithelial-mesenchymal transition, EMT), как повышение уровня N-кадгерина и фибронектина. Уровень E-кадгерина при этом снижался. Примечательно, что NET положительно регулируют экспрессию генов нескольких факторов, связанных с провоспалительными и прометастатическими свойствами. Сопоставление данных, представленных в атласе генома рака, с результатами секвенирования РНК в образцах рака молочной железы выявило значительную корреляцию между экспрессией проопухолевых генов и экспрессией генов, продукты которых участвуют во взаимодействии с нейтрофилами. Следовательно, в клетках рака молочной железы человека NET управляют прометастатическим фенотипом посредством активации программы EMT.

NET препятствуют деятельности цитотоксических клеток

Еще одна важная функция NET – способность «скрывать» опухолевые клетки от цитотоксических иммунных клеток. Недавно показали, что хемокины группы CXCL, выделяемые опухолевыми клетками, провоцируют нетоз у TAN [48]. Образующиеся NET обволакивают опухоль, используя нити ДНК, и образуют физическое препятствие для взаимодействия T- и NK-клеток с опухолями (рис. 2, III). Кроме того, как обнаружено недавно, NET могут содержать супрессорные молекулы (например, PD-L1) и негативно влиять на активность цитотоксических лимфоцитов (рис. 2, II) [49]. Особую роль в исследовании NET должны занять работы по терапии онкопатологий с помощью перепрограммированных T-клеток с индуцированной цитолитической активностью. Все более реальной становится CAR-T-терапия гематологических опухолей человека с использованием подходов персонализированной медицины [50, 51]. Вместе с тем, возможности CAR-T-терапии солидных опухолей весьма ограничены [52]. Вполне вероятно, что в этом случае NET могут быть важной мишенью, обеспечивающей преодоление барьеров на пути к эффективной CAR-T-терапии.

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ И ВОЗДЕЙСТВИЯ НА NET

На основании последних исследований NET можно назвать многообещающей терапевтической мишенью при онкологических заболеваниях. Судя по важной роли NET в увеличении метастатического потенциала злокачественных клеток, ингибирование образования и активности NET в опухолях может сделать прогноз выживаемости пациентов более оптимистичным [11].

Маркеры NET

Для проведения клинического скрининга NET необходимо иметь стандартизованный протокол определения референтных уровней нетоза. Однако метод, обладающий 100% надежностью, еще не описан. Простейшие средства обнаружения NET *in vivo* включают количественное определение таких связанных с NET веществ, как циркулирующая внеклеточная ДНК, H3-cit, NE и MPO, в крови. Например, с помощью простого анализа окрашивания нуклеиновой кислоты в образцах сыворотки пациентов с колоректальным раком и раком молочной железы определено количество свободно циркулирующей ДНК [53, 54]. Хотя известно, что количество циркулирующей ДНК коррелирует с размером опухоли молочной железы и ее злокачественностью [55], метод измерения нетоза путем прямого окрашивания ДНК недостаточно специфичен. Повышенное количество внеклеточной ДНК (cell-free DNA, cfDNA) в сыворотке больных раком может быть связано и с другими факторами, такими, как апоптотические и некротические клетки, микроорганизмы, проникающие в системный кровоток при повышении проницаемости стенки кишечника [56]. Измерение циркулирующих конъюгатов MPO-ДНК более специфично для образования NET, чем оценка только внеклеточной ДНК [57]. H3-cit возникает в результате PAD4-опосредованного цитруллинирования во время образования NET и представляет собой наиболее специфичный маркер циркулирующих NET [58]. Кроме того, H3-cit может иметь прогностическое значение, поскольку высокое содержание H3-cit в плазме является значимым показателем повышенной смертности пациентов с поздней стадией рака [40]. Другие же маркеры NET, включая NE и MPO, не имеют строгой корреляции с онкологическими патологиями, поскольку могут высвобождаться в ходе дегрануляции нейтрофилов без образования NET. Таким образом, на сегодняшний день самым надежным индикатором нетоза является H3-cit.

NET как терапевтическая мишень

Согласно приведенным в обзоре Jorch и Kubes [59] данным, подавляющее большинство экспериментальных и клинических исследований NET проведено при неопухолевых патологиях, таких, как аутоиммунные, легочные заболевания или осложнения аутоиммунных состояний. Особый интерес в изучении роли NET вызывают аутоиммунные патологии, характеризующиеся высоким уровнем антител к ДНК [60–64]. Так при системной красной волчанке (СКВ) сывороточная ДНКазы I важна для гидролиза хроматина NET. Более того, у некоторых пациентов с СКВ дисфункция ДНКазы I вызывает тяжелые по-

вреждения почек, что подчеркивает важность баланса между формированием и деградацией NET [65]. Обнаружение связей между NET и ДНКазой I, а также NET с развитием опухолей стимулировало исследования, направленные на выяснение возможности использования ДНКазы I в терапии онкологических заболеваний. Для этого рекомбинантную ДНКазу I вводили мышам, в организме которых развивались опухоли. Введение активного фермента таким животным негативно влияло на рост новообразований. Например, лечение ДНКазой I снизило вызванные образованием NET нарушения кровообращения и перфузии внутренних органов в моделях рака молочной железы [36]. Более того, в мышинной модели внутрибрюшинного сепсиса, имитирующего послеоперационную воспалительную среду, ДНКазы I нарушает взаимодействие NET и циркулирующих опухолевых клеток *in vivo* [44]. Системное введение ДНКазы I также уменьшает число метастазов у мышей, моделирующих метастатический рак легкого [45], а наночастицы, покрытые ДНКазой I, оказывают даже более сильный эффект за счет стабилизации фермента. Наночастицы ДНКазы I гидролизовали NET *in vitro* и блокировали образование метастазов рака молочной железы в легкие *in vivo*, хотя не влияли на рост первичной опухоли [11, 66]. Недавно разработан новый способ увеличения активности ДНКазы I в плазме. С этой целью использовали опосредованный вектором на основе аденоассоциированного вируса перенос гена ДНКазы I в гепатоциты [67]. Однократная внутривенная инъекция вирусных частиц привела к подавлению развития метастазов в мышинной модели колоректального рака и способствовала увеличению числа CD8⁺ Т-клеток в опухолях [68, 69]. Эти обнадеживающие результаты на животных являются основанием для клинических исследований по использованию ДНКазы I в качестве противоопухолевого препарата.

Применение ингибиторов молекул, участвующих в нетозе и препятствующих образованию NET, которые уже используют при неопухолевых патологиях, логично расширить на онкологических больных после клинического тестирования. В спектр этих препаратов входят ингибиторы NE, используемые при хронической обструктивной болезни легких, и ингибиторы PAD4. Эти соединения могут улучшить клинический исход больных раком [25] даже несмотря на то, что коммерчески доступные ингибиторы PAD4, например, Cl-амидин, имеют короткий период полураспада в сыворотке крови [70]. В качестве альтернативного ингибитора образования NET предложено применять простагландин E₂ (PGE₂), который через рецепторы EP₂ или EP₄ негативно влияет на нетоз как у мышей, так и у пациентов, кото-

рым трансплантировали гемопоэтические стволовые клетки [71]. Показано также, что PGE₂ ингибирует образование NET, индуцированное как раковыми клетками, так и PMA, вероятно, за счет повышения концентрации внутриклеточного cAMP и снижения концентрации внутриклеточного Ca²⁺, необходимого для образования NET, а также, что антитромбин значительно снижает образование NET, вызванное опухолевыми клетками [72]. Кроме перечисленных ингибиторов нетоза, ингибитор NET хлорохин снижает агрегацию тромбоцитов в крови, уровень циркулирующего тканевого фактора (фактора свертывания III) и уменьшает гиперкоагуляцию у мышей с опухолью. Аналогичные эффекты выявлены у пациентов со злокачественными новообразованиями [37].

К сожалению, до сих пор еще только ведутся клинические испытания, и не определен оптимальный способ воздействия на NET (NCT03781531, NCT04177576, NCT04294589, NCT01491230, NCT01533779).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уникальная роль NET в онкогенезе, включающая способность инициировать неопластическую трансформацию, ускорять рост опухоли и метастазирование, а также повышать устойчивость к противоопухолевой терапии, делает их перспективной терапевтической мишенью. Появляется все больше исследований, направленных на применение различных подходов к разрушению NET в онкологии, в том числе использование ДНКазы I. Использование ДНКазы I подразумевает, что деградации будет подвергаться не только NET, но и внеклеточная ДНК, что должно обеспечить более эффективное ингибирование опухолевого процесса. Оптимальный способ борьбы с NET пока не определен, а будущие исследования должны быть сосредоточены на изучении регуляции нетоза и баланса между образованием и разрушением NET, чтобы воздействовать на NET, не нарушая функций иммунной системы. К тому же существуют данные, согласно которым в качестве элемента, препятствующего онкотерапии, следует рассматривать не только NET, но и плотные межклеточные контакты, которые поддерживают целостность солидных эпителиальных опухолей и препятствуют проникновению объемных агентов, в том числе Т-клеток и НК-клеток, в глубь опухоли. В областях межклеточного контакта эпителиальных клеток функционирует белок десмоглеин 2, который обеспечивает структурное сцепление соседних клеток [73]. Разработаны рекомбинантные белки, названные «открывателями контактов», которые связывают десмоглеин 2, вызывая временное и специфическое открытие плотных контактов, что позволяет различ-

ным терапевтическим средствам проникать в опухоли [74, 75]. Возможно, совместное использование ДНКазы I и «открывателей контактов» могло бы увеличить эффективность противоопухолевой терапии, поскольку способствовало бы эффективному про-

никновению агентов, в том числе цитотоксических клеток, в глубь злокачественного новообразования. ●

*Работа выполнена при поддержке МОН РФ
(грант № 075-15-2020-773).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Stepanov A.V., Belogurov A.A.J., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 6. P. e20991.
- Ukrainskaya V.M., Rubtsov Y.P., Knorre V.D., Maschan M.A., Gabibov A.G., Stepanov A.V. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. № 4. P. 33–41.
- Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodeneev V.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.
- Ukrainskaya V.M., Stepanov A.V., Glagoleva I.S., Knorre V.D., Belogurov A.A.J., Gabibov A.G. // *Acta Naturae*. 2017. V. 9. № 3. P. 55–63.
- Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., Shilova O., Ryabova A., Schulga A., Stremovskiy O., Zdobnova T., Balalaeva I., Deyev S. // *J. Control. Release*. 2016. V. 233. P. 48–56.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. // *Science* (80-). 2004. V. 303. № 5663. P. 1532–1535.
- Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutierrez M.G., Brown G.D., Papayannopoulos V. // *Nat. Immunol.* 2014. V. 15. № 11. P. 1017–1025.
- Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abu-Abed U., Kühn L., Ben-Ezra J., Elhasid R., Zychlinsky A. // *Front. Immunol.* 2013. V. 4. P. 48.
- Oklu R., Sheth R.A., Wong K.H.K., Jahromi A.H., Albadawi H. // *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 2017. V. 7. Suppl. 3. P. S140–S149.
- Richardson J.J.R., Hendrickse C., Gao-Smith F., Thickett D.R. // *Int. J. Inflam.* 2017. V. 2017. P. 4915062.
- Park J., Wysocki R.W., Amoozgar Z., Maiorino L., Fein M.R., Jorns J., Schott A.F., Kinugasa-Katayama Y., Lee Y., Won N.H., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2016. V. 8. № 361. P. 138.
- Delgado-Rizo V., Martínez-Guzmán M., Iñiguez-Gutierrez L., García-Orozco A., Alvarado-Navarro A., Fafutis-Morris M. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 81.
- Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 191. № 3. P. 677–691.
- Wang Y., Li M., Stadler S., Correll S., Li P., Wang D., Hayama R., Leonelli L., Han H., Grigoryev S.A., et al. // *J. Cell Biol.* 2009. V. 184. № 2. P. 205–213.
- Yang H., Biermann M.H., Brauner J.M., Liu Y., Zhao Y., Herrmann M. // *Front. Immunol.* 2016. V. 7. P. 302.
- Radic M., Neeli I. // *Front. Immunol.* 2013. V. 4. P. 38.
- Hoppenbrouwers T., Autar A.S.A., Sultan A.R., Abraham T.E., van Cappellen W.A., Houtsmuller A.B., van Wamel W.J.B., van Beusekom H.M.M., van Neck J.W., de Maat M.P.M. // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 5. P. e0176472.
- Naffah de Souza C., Breda L.C.D., Khan M.A., Almeida S.R. de, Câmara N.O.S., Swezey N., Palaniyar N. // *Front. Immunol.* 2018. V. 8. P. 1849.
- Douda D.N., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 9. P. 2817–2822.
- Lood C., Blanco L.P., Purmalek M.M., Carmona-Rivera C., De Ravin S.S., Smith C.K., Malech H.L., Ledbetter J.A., Elkon K.B., Kaplan M.J. // *Nat. Med.* 2016. V. 22. № 2. P. 146–153.
- Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., et al. // *Nat. Med.* 2007. V. 13. № 4. P. 463–469.
- Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., Brinkmann V., von Bernuth H., Zychlinsky A. // *Elife*. 2017. V. 6. P. e24437.
- Urban C.F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., Brinkmann V., Jungblut P.R., Zychlinsky A. // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. № 10. P. e1000639.
- Fadini G.P., Menegazzo L., Rigato M., Scattolini V., Poncina N., Bruttocao A., Ciciliot S., Mammano F., Ciubotaru C.D., Brocco E., et al. // *Diabetes*. 2016. V. 65. № 4. P. 1061–1071.
- Brinkmann V. // *J. Innate Immun.* 2018. V. 10. № 5–6. P. 414–421.
- Cools-Lartigue J., Spicer J., Najmeh S., Ferri L. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2014. V. 71. № 21. P. 4179–4194.
- Sangaletti S., Tripodo C., Vitali C., Portararo P., Guarnotta C., Casalini P., Cappetti B., Miotti S., Pinciroli P., Fuligni F., et al. // *Cancer Discov.* 2014. V. 4. № 1. P. 110–129.
- Homa-Mlak I., Majdan A., Mlak R., Małeczka-Massalska T. // *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. 2016. V. 70. P. 887–895.
- Masucci M.T., Minopoli M., Carriero M.V. // *Front. Oncol.* 2019. V. 9. P. 1146.
- Powell D.R., Huttenlocher A. // *Trends Immunol.* 2016. V. 37. № 1. P. 41–52.
- Yazdani H.O., Roy E., Comerci A.J., van der Windt D.J., Zhang H., Huang H., Loughran P., Shiva S., Geller D.A., Bartlett D.L., et al. // *Cancer Res.* 2019. V. 79. № 21. P. 5626–5639.
- Jung H.S., Gu J., Kim J.-E., Nam Y., Song J.W., Kim H.K. // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 4. P. e0216055.
- Li Y., Yang Y., Gan T., Zhou J., Hu F., Hao N., Yuan B., Chen Y., Zhang M. // *Int. J. Oncol.* 2019. V. 55. № 1. P. 69–80.
- Demers M., Krause D.S., Schatzberg D., Martinod K., Voorhees J.R., Fuchs T.A., Scadden D.T., Wagner D.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 32. P. 13076–13081.
- Demers M., Wagner D.D. // *Oncoimmunology*. 2013. V. 2. № 2. P. e22946.
- Cedervall J., Zhang Y., Huang H., Zhang L., Femel J., Dimberg A., Olsson A.-K. // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 13. P. 2653–2662.
- Boone B.A., Murthy P., Miller-Ocuin J., Doerfler W.R., Ellis J.T., Liang X., Ross M.A., Wallace C.T., Sperry J.L., Lotze M.T., et al. // *BMC Cancer*. 2018. V. 18. № 1. P. 678.
- Demers M., Wagner D.D. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2014. V. 40. № 3. P. 277–283.
- Seo J. Do, Gu J.-Y., Jung H.S., Kim Y.J., Kim H.K. // *Clin. Appl. Thromb.* 2019. V. 25. P. 1076029618825310.
- Thålin C., Lundström S., Seignez C., Daleskog M., Lundström A., Henriksson P., Helleday T., Phillipson M., Wallén H., Demers M. // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 1. P. e0191231.
- Tohme S., Yazdani H.O., Al-Khafaji A.B., Chidi A.P., Loughran P., Mowen K., Wang Y., Simmons R.L., Huang H., Tsung A. // *Cancer Res.* 2016. V. 76. № 6. P. 1367–1380.
- Guglietta S., Chiavelli A., Zagato E., Krieg C., Gandini S.,

- Ravenda P.S., Bazolli B., Lu B., Penna G., Rescigno M. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. № 1. P. 11037.
43. Szczerba B.M., Castro-Giner F., Vetter M., Krol I., Gkoutela S., Landin J., Scheidmann M.C., Donato C., Scherrer R., Singer J., et al. // *Nature*. 2019. V. 566. № 7745. P. 553–557.
44. Najmeh S., Cools-Lartigue J., Rayes R.F., Gowing S., Vourtzoumis P., Bourdeau F., Giannias B., Berube J., Rousseau S., Ferri L.E., et al. // *Int. J. Cancer*. 2017. V. 140. № 10. P. 2321–2330.
45. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., Gowing S., Chow S., Giannias B., Bourdeau F., Kubes P., Ferri L. // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. № 8. P. 3446–3458.
46. Monti M., De Rosa V., Iommelli F., Carriero M.V., Terlizzi C., Camerlingo R., Belli S., Fonti R., Di Minno G., Del Vecchio S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 8. P. 2350.
47. Martins-Cardoso K., Almeida V.H., Bagri K.M., Rossi M.I., Mermelstein C.S., König S., Monteiro R.Q. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 6. P. 1542.
48. Teijeira Á., Garasa S., Gato M., Alfaro C., Migueliz I., Cirella A., de Andrea C., Ochoa M.C., Otano I., Etxeberria I., et al. // *Immunity*. 2020. V. 52. № 5. P. 856–871.
49. Zhang H., van der Windt D.J., Ren J., Tsung A., Huang H. // *J. Immunol.* 2019. V. 202. № 1. P. 135.
50. Stepanov A.V., Markov O.V., Chernikov I.V., Gladkikh D.V., Zhang H., Jones T., Sen'kova A.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Kalinin R.S., et al. // *Sci. Adv.* 2018. V. 4. № 11. P. 4580.
51. Huang J., Alexey S., Li J., Jones T., Grande G., Douthit L., Xie J., Chen D., Wu X., Michael M., et al. // *Leukemia*. 2019. V. 33. № 9. P. 2315–2319.
52. Kalinin R.S., Petukhov A.V., Knorre V.D., Maschan M.A., Stepanov A.V., Gabibov A.G. // *Acta Naturae*. 2018. V. 10. № 2. P. 16–23.
53. Agassi R., Czeiger D., Shaked G., Avriel A., Sheynin J., Lavrenkov K., Ariad S., Douvdevani A. // *Am. J. Clin. Pathol.* 2015. V. 143. № 1. P. 18–24.
54. Czeiger D., Shaked G., Eini H., Vered I., Belochitski O., Avriel A., Ariad S., Douvdevani A. // *Am. J. Clin. Pathol.* 2011. V. 135. № 2. P. 264–270.
55. Kohler C., Radpour R., Barekati Z., Asadollahi R., Bitzer J., Wight E., Bürki N., Diesch C., Holzgreve W., Zhong X.Y. // *Mol. Cancer*. 2009. V. 8. № 1. P. 105.
56. Bronkhorst A.J., Ungerer V., Diehl F., Anker P., Dor Y., Fleischhacker M., Gahan P.B., Hui L., Holdenrieder S., Thierry A.R. // *Hum. Genet.* 2021. V. 140. № 4. P. 565–578.
57. Yoo D., Floyd M., Winn M., Moskowitz S.M., Rada B. // *Immunol. Lett.* 2014. V. 160. № 2. P. 186–194.
58. Mauracher L.-M., Posch F., Martinod K., Grilz E., Däullary T., Hell L., Brostjan C., Zielinski C., Ay C., Wagner D.D., et al. // *J. Thromb. Haemost.* 2018. V. 16. № 3. P. 508–518.
59. Jorch S.K., Kubes P. // *Nat. Med.* 2017. V. 23. № 3. P. 279–287.
60. Gabibov A.G., Ponomarenko N.A., Tretyak E.B., Paltsev M.A., Suchkov S.V. // *Autoimmun. Rev.* 2006. V. 5. № 5. P. 324–330.
61. Belogurov A.J., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *Bioessays*. 2009. V. 31. № 11. P. 1161–1171.
62. Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. № 1. P. 87–95.
63. Gololobov G.V., Mikhalap S.V., Starov A.V., Kolesnikov A.F., Gabibov A.G. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1994. V. 47. № 2–3. P. 305.
64. Kozyr A.V., Kolesnikov A.V., Zelenova N.A., Sashchenko L.P., Mikhalap S.V., Bulina M.E., Ignatova A.N., Favorov P.V., Gabibov A.G. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000. V. 83. № 1–3. P. 255–268.
65. Hakkim A., Fürnrohr B.G., Amann K., Laube B., Abed U.A., Brinkmann V., Herrmann M., Voll R.E., Zychlinsky A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 21. P. 9813–9818.
66. Hollmén M., Karaman S., Schwager S., Lisibach A., Christiansen A.J., Maksimow M., Varga Z., Jalkanen S., Detmar M. // *Oncoimmunology*. 2016. V. 5. № 3. P. 1115177.
67. Xia Y., He J., Zhang H., Wang H., Tetz G., Maguire C.A., Wang Y., Onuma A., Genkin D., Tetz V., et al. // *Mol. Oncol.* 2020. V. 14. № 11. P. 2920–2935.
68. Alcazar-Leyva S., Ceron E., Masso F., Montano L.F., Gorocica P., Alvarado-Vasquez N. // *Med. Sci. Monit.* 2009. V. 15. № 2. P. 51–55.
69. Alekseeva L.A., Sen'kova A.V., Zenkova M.A., Mironova N.L. // *Mol. Ther. – Nucl. Acids*. 2020. V. 20. P. 50–61.
70. Knight J.S., Subramanian V., O'Dell A.A., Yalavarthi S., Zhao W., Smith C.K., Hodgins J.B., Thompson P.R., Kaplan M.J. // *Ann. Rheum. Dis.* 2015. V. 74. № 12. P. 2199–2206.
71. Domingo-Gonzalez R., Martínez-Colón G.J., Smith A.J., Smith C.K., Ballinger M.N., Xia M., Murray S., Kaplan M.J., Yanik G.A., Moore B.B. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015. V. 193. № 2. P. 186–197.
72. Shishikura K., Horiuchi T., Sakata N., Trinh D.-A., Shirakawa R., Kimura T., Asada Y., Horiuchi H. // *Br. J. Pharmacol.* 2016. V. 173. № 2. P. 319–331.
73. Shilova O., Shilov E., Lieber A., Deyev S. // *J. Control. Release*. 2018. V. 286. P. 125–136.
74. Pitner R., Kim J., Davis-Bergthold J., Turner C., Stermann E., Adams J., Carter L., Ahlgren J., Fender P., Lieber A., et al. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 1–13.
75. Choi I.-K., Strauss R., Richter M., Yun C.-O., Lieber A. // *Front. Oncol.* 2013. V. 3. P. 193.