

Received: 2015.10.11
Accepted: 2016.07.11
Published: 2016.08.31

NEToza a potencjał przerzutowy w chorobach nowotworowych

Metastatic potential of NET in neoplastic disease

Iwona Homa-Mlak¹, Aleksandra Majdan^{1,2}, Radosław Mlak¹,
Teresa Małecka-Massalska¹

¹Katedra i Zakład Fizjologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

²Katedra i Klinika Reumatologii i Układowych Chorób Tkanki Łącznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Streszczenie

W odpowiedzi na różne bodźce neutrofile oraz eozynofile mogą uwalniać zewnątrzkomórkową sieć (neutrophil extracellular traps - NET), złożoną z enzymów proteolitycznych, DNA oraz innych składników jądra komórkowego. Proces NETozy został scharakteryzowany jako mechanizm programowanej śmierci komórki, który prowadzi do de kondensacji chromatyny w jądrze, dezintegracji organelli komórkowych i mieszania się ich składników, a następnie lizy błony komórkowej.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na rolę neutrofilów w patomechanizmie nowotworów. Wykazano, że neutrofile związane z guzem (tumor-associated neutrophils, TAN) tworzą ważny element mikrośrodowiska guza. Udowodniono obecność dwóch subpopulacji TAN o odmiennym fenotypie oraz funkcjach działającej przeciwnowotworowo „N1” i pronowotworowo „N2”. Przez uwalnianie cytokiny i chemokiny mogą się przyczyniać m.in. do ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego oraz angiogenezy. Interakcje zachodzące między komórkami a mikrośrodowiskiem mają podstawowe znaczenie zarówno dla zachowania homeostazy w prawidłowej tkance, jak i wzrostu guza. Wpływają na inicjację choroby, progresję oraz rokowanie.

Wpływ NETozy na proces przerzutowania jest oceniany w kontekście funkcji pełnionych przez poszczególne komponenty NET (m.in.: MMP-9, CG, NE). Ponadto, skutek działania pro- lub przeciwnowotworowy NETozy zależy od wielu czynników m.in. stanu układu immunologicznego czy mikrośrodowiska guza. Prawdopodobnie komórki nowotworowe mogą być wychwytywane przez NET z mikrośrodowiska w taki sam sposób jak mikroorganizmy. Jednak duże stężenie białek uwalnianych w czasie NETozy może indukować ich proliferację i hamować apoptozę, promując tym samym rozwój guza. Lepsze zrozumienie funkcji NETozy w progresji nowotworu może ujawnić nowe czynniki prognostyczne oraz punkty uchwytu dla terapii w wielu typach nowotworów.

Słowa kluczowe:

NET • NEToza • neutrofile • choroby nowotworowe • powstawanie przerzutów • przeciwnowotworowa odpowiedź immunologiczna

Summary

In response to various stimuli, neutrophils and eosinophils can release neutrophil extracellular traps (NET) consisting of proteolytic enzymes, DNA and other components of the cell nucleus. The NETosis process has been characterized as a mechanism of programmed cell death, which leads to chromatin decondensation and disintegration of organelles, followed by lysis of the cell membrane. In recent years the significant role of neutrophils in the pathogenesis of cancer has been highlighted. The presence of two subpopulations of TAN with different phenotypes and functions – acting antitumor “N1” and the pro-cancerous “N2” – has been discovered. By the release of cytokines and chemokines neutrophils may affect angiogenesis

and contribute to escape of tumor cells from immune surveillance. Interactions between cells and the microenvironment are of vital importance both for the preservation of homeostasis in normal tissue and tumor growth. They affect the initiation of disease progression and prognosis. The impact of NETosis on the process of metastasis is evaluated in the context of the functions of the individual components of the NET (MMP-9, CG, NE). Furthermore, presumably the pro- or anti-tumor effect of NETosis depends on many factors including the status of the immune system or tumor microenvironment. Probably the cancer cells can be captured by the NET microenvironment in the same manner as microorganisms. However, the high concentration of proteins released during NETosis can induce their proliferation and inhibit apoptosis, thus promoting tumor growth. A better understanding of NETosis function in tumor progression may lead to the emergence of new prognostic factors and targets for therapy in many types of cancer.

Key words: NET • neutrophils • neoplastic diseases • metastasis potential • anti-tumor immune response

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1216275>

Word count: 3143
Tables: –
Figures: 1
References: 46

Adres autorki: dr n. med. Iwona Homa-Mlak, Katedra i Zakład Fizjologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin; e-mail: iwona.homa@wp.pl

Wykaz skrótów: **białko BPI** - białko bakteriobójcze/zwiększające przepuszczalność błony (bactericidal/permeability-increasing protein), **CAF** - fibroblasty związane z nowotworem (cancer-associated fibroblasts), **CG** - katepsyna G (cathepsin G), **CTC** - limfocyt T cytotoksyczny (cytotoxic T cell), **DCs** - komórki dendrytyczne (dendritic cells), **ECM** - macierz pozakomórkowa (extracellular matrix), **EMT** - przejście epitelialno-mezenchymale komórek nabłonkowych (epithelial to mesenchymal transition), **FGF** - czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor), **fMLP** - formyl metionyl-leucyl-fenylalanina, **G-CSF** - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (granulocyte colony-stimulating factor), **HIF-1 alfa** - czynnik indukowany hipoksją 1 alfa, **IL** - interleukina, **IRS-1** - substrat dla receptora insuliny (insulin receptor substrate-1), **komórka ATC** - aktywna komórka T (activated T cell), **komórki NK** - naturalni zabójcy (natural killer cells), **limfocyt Th** - limfocyt T pomocniczy (T helper cells), **limfocyt Treg** - limfocyt T regulatorowy (regulatory T cells), **LPS** - lipopolisacharyd, **MCP** - chemotaktyczne białko monocytów (monocyte chemotactic protein), **MDSCs** - heterogenna populacja komórek układu immunologicznego o aktywności immunosupresyjnej wywodząca się z linii mieloidalnej (myeloid-derived suppressor cells), **MMP-9** - metaloproteinaza macierzy 9 (matrix metalloproteinase 9), **MPO** - mieloperoksydaza (myeloperoxidase), **NADPH** - oksydaza dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, **NE** - elastaza neutrofilii (neutrophil elastase), **NEi** - inhibitor elastazy neutrofilii (neutrophil elastase inhibitor), **NET** - zewnątrzkomórkowa siatka neutrofilii (neutrophil extracellular traps), **NF-κB** - kompleks białkowy NFκB (czynnik transkrypcyjny; nuclear factor kappa B), **NO** - tlenek azotu, **NSPs** - kationowe proteazy serynowe neutrofilii (neutrophil serine proteases), **PAD4** - deiminaza peptydyloargininowa 4 (peptidylarginine deiminase 4), **PDGF** - płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor), **POChP** - przewlekła obturacyjna choroba płuc (chronic obstructive pulmonary disease), **PR3** - proteinaza 3 (proteinase 3), **RAGE** - wieloligandowy receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji (receptor for advanced glycation endproducts), **rbPI** - bakteriobójcze rekombinowane białko zwiększające przepuszczalność (recombinant bactericidal permeability increasing protein), **ROS** - reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species), **SLPI** - inhibitor proteazy leukocytów pochodzący z surowicy (serum leukocyte protease inhibitor), **TAM** - makrofagi związane z guzem (tumor-associated macrophages), **TAN** - neutrofile związane z guzem (tumor-associated neutrophils), **TGF-β** - transformujący czynnik wzrostu β (transforming growth factor-β), **TIMPs** - tkankowe inhibitory metaloproteinazy (tissue inhibitors of metalloproteinases), **TME** - mikrośrodowisko guza (tumor micro environment), **TNF** - czynnik martwicy guza (tumor necrosis factor), **VEGF** - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor).

ZEWNĄTRZKOMÓRKOWA SIĘĆ NEUTROFIŁI

W odpowiedzi na różnego rodzaju bodźce neutrofile oraz eozynofile mogą uwalniać zewnątrzkomórkową sieć (neutrophil extracellular traps - NET), złożoną z enzymów proteolitycznych, DNA oraz innych składników jądra komórkowego. Proces NETozy został scharakteryzowany jako mechanizm programowanej śmierci komórki, który prowadzi do dekondensacji chromatyny w jądrze, dezintegracji organelli komórkowych i mieszania się ich składników, a następnie lizy błony komórkowej. W niektórych przypadkach obserwowano szybkie uwolnienie chromatyny w wyniku egzocytozy [3,4,24]. Proces NETozy po raz pierwszy opisali Zychlinsky i wsp. jako odmienny od dotychczas poznanych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko bakteriom, grzybom i pasożytom [4,24].

Powstanie sieci NET mogą indukować bakteryjne lipopolisacharydy (LPS), formyl metionyl-leucyl-fenylalanina (fMLP), roślinne estry forbolu (np. octan mirystynianu forbolu, PMA) jak również aktywowane płytki krwi, cytokiny: czynnik martwicy guza- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) oraz interleukina 8 (IL-8). Ponadto zauważono, że te cytokiny są często wydzielane przez różne nowotwory oraz że ułatwiają proces formowania się sieci NET. Jednak dotychczasowe badania nie wykazały jednoznacznie ich wpływu na formowanie NET w ogniskach przerzutowych [3,4,19].

Podczas formowania NET-u zaobserwować można zmiany morfologiczne zachodzące w neutrofilach. Wkrótce po indukcji procesu w błonie komórkowej pojawiają się wypustki, następnie dochodzi do spłaszczenia komórki. Molekularne mechanizmy powodujące powstanie NET-u pozostają niewyjaśnione. Jedną z najbardziej charakterystycznych cech tego typu struktur jest dekondensacja chromatyny. Decydującą rolę odgrywa tu cytrulinacja histonu H3 zachodząca na skutek aktywacji deiminazy peptydyloargininowej 4 (peptidylarginine deiminase 4, PAD4). Ważne znaczenie PAD4 oraz procesu cytrulinacji w formowaniu NET-u udowodniono w badaniach na komórkach ludzkiej białaczki promielocytowej (human promyelocytic leukemia cells, HL60) z zablokowanym białkiem PAD4 oraz u myszy pozbawionych, za pomocą inżynierii genetycznej, kodującego go genu. W obu przypadkach brak było zdolności do tworzenia struktur NET-u. Wykazano, że podwyższona ekspresja PAD4 w linii komórkowej kostniakomięsaka jest wystarczającym czynnikiem indukującym dekondensację chromatyny. Nie jest jednak wyjaśnione w jaki sposób aktywność oraz ekspresja PAD4 może regulować funkcje neutrofile oraz dlaczego w niektórych przypadkach jest uwalniana jedynie zawartość jądra komórkowego. Innym czynnikiem warunkującym uwalnianie chromatyny przez neutrofile są reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species, ROS). Wytwarzanie ROS zależy od aktywności oksydazy NADPH, szlaków Raf-MEK-ERK i p38MAPK. Natomiast inne związki zdolne aktywować formowanie sieci NET mogą powstawać w sposób niezależny od aktywności oksydazy NADPH.

Ostatecznie do wyrzutu DNA oraz nasilenia procesu kondensacji chromatyny przyczyniają się magazynowane w ziarnistościach neutrofile: elastaza (neutrophil elastase, NE) oraz potęgująca ten proces mieloperoxydaza (myeloperoxidase, MPO). W następstwie zahamowania NE w wyniku działania inhibitora elastazy neutrofile (neutrophil elastase inhibitor, NEi) oraz pochodzącego z surowicy inhibitora proteazy leukocytów (serum leukocyte protease inhibitor, SLPI) procesy, takie jak dekondensacja chromatyny, degranulacja jądra i śmierć neutrofile i NEToza są zaburzone [7,9,13,15,19].

Dzięki mikroskopii elektronowej udało się scharakteryzować strukturę wyrzucanej z neutrofile do środowiska zewnętrznego sieci NET. Jest zbudowana z nitkowatego szkieletu, który tworzą włókna DNA o grubości 17 nm. Mogą oddziaływać między sobą i tworzyć znacznie grubsze włókna (nawet do 50 nm). Struktura jest utrzymywana przez wiele białek pochodzenia granularnego: MPO, kalprotektyna (calprotectin), metaloproteinaza macierzy 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9), białko BPI (bactericidal/permeability-increasing protein), kationowe proteazy serynowe: NE, katepsyna G (cathepsin G, CG), proteinaza 3 (proteinase 3, PR3). Są one odpowiedzialne, bezpośrednio lub pośrednio, za śmierć bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, grzybów oraz inaktywację wirusów. NETozę szczególnie często można obserwować w miejscu toczącego się stanu zapalnego np. zapaleniu wyrostka robaczkowego, w czasie zakażenia paciorkowcami (powodującego martwicze zapalenie powięzi i pneumokokowe zapalenie płuc), w modelach doświadczalnych w zakażeniu szczepem pałeczek bakterii z rodzaju *Shigella* lub w stanie przedrzucawkowym [13,15,25].

NEUTROFILE I ICH ROLA W CHOROBYCH NOWOTWOROWYCH

Neutrofile (granulocyty obojętnochłonne, komórki polimorfonuklearne, PMN) są największą grupą (50-70%) krążących we krwi obwodowej leukocytów. Odgrywają znaczącą rolę w odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko mikroorganizmom (takim jak: chorobotwórcze bakterie, grzyby) oraz wspomagają gojenie się ran. Głównym mechanizmem obrony, który wykorzystują neutrofile jest fagocytoza. Pierwszym i najważniejszym ogniwem procesu jest aktywny kompleks oksydazy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) warunkujący powstanie reaktywnych form tlenu oraz zapoczątkowanie kaskady reakcji prowadzących do powstania innych toksycznych związków tlenowych. Ponadto w ziarnistościach neutrofile zidentyfikowano liczne peptydy w tym enzymy niszczące mikroorganizmy. Oba mechanizmy warunkują skuteczność fagocytozy [6,12,17].

W ostatnich latach zwrócono uwagę na znaczącą rolę neutrofile, nie tylko w zwalczaniu patogenów czy chorobach autoimmunologicznych, ale również w patomechanizmie nowotworów. Wykazano,

że oprócz makrofagów, limfocytów czy komórek NK (natural killer cells, NK cells) neutrofile związane z guzem (tumor-associated neutrophils, TAN) są ważnym elementem mikrośrodowiska guza. Wykazano obecność dwóch subpopulacji TAN o odmiennym fenotypie oraz funkcjach: działające przeciwnowotworowo „N1” oraz pronowotworowo „N2” [nazwy analogiczne jak w przypadku makrofagów infiltrujących mikrośrodowisko nowotworu (tumor-associated macrophages, TAM) - M1 oraz M2]. Nie wyjaśniono jeszcze wszystkich funkcji jakie pełnią TAN. Przez uwalnianie cytokiny i chemokiny mogą się przyczyniać m.in. do ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego oraz wpływać na angiogenezę. Zauważono, że w pewnych warunkach, przy ograniczonym wpływie transformującego czynnika wzrostu β (transforming growth factor- β , TGF- β), TAN N2 mogą ulegać konwersji do N1, których działanie ma charakter prozapalny i przeciwnowotworowy. Możliwym wydaje się, że na przeciw- lub pronowotworowe działanie TAN decydujący wpływ ma zaburzenie równowagi na korzyść jednej z tych subpopulacji komórek [12,38].

Wydzielane przez komórki nowotworowe cytokiny, takie jak: czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor, VEGF), IL-1b oraz IL-6 przyczyniają się do wzrostu liczby neutrofilii oraz indukują ich właściwości immunosupresyjne. Neutrofilie stwierdzono w wielu nowotworach m.in.: płuca, trzustki, piersi oraz czerniaka. Ponadto związana jest z gorszym rokowaniem u chorych na raka płuca, nerki oraz przerzutowego raka czerniaka. Obecność neutrofilii jest swoistym nowotworowo, niezależnym czynnikiem prognostycznym czasu wolnego od nawrotu choroby, jak również przeżycia całkowitego (overall survival, OS) w zaawansowanym jasno-komórkowym raku nerki oraz raku płaskonabłonkowym głowy i szyi. Ponadto koreluje ze stopniem zaawansowania glejaków oraz bardziej agresywnym przebiegiem raka trzustki. Natomiast u chorych na raka żołądka zaobserwowano, że duża liczba neutrofilii wiąże się z korzystnym rokowaniem [12,13,15,17,21,22,23,38].

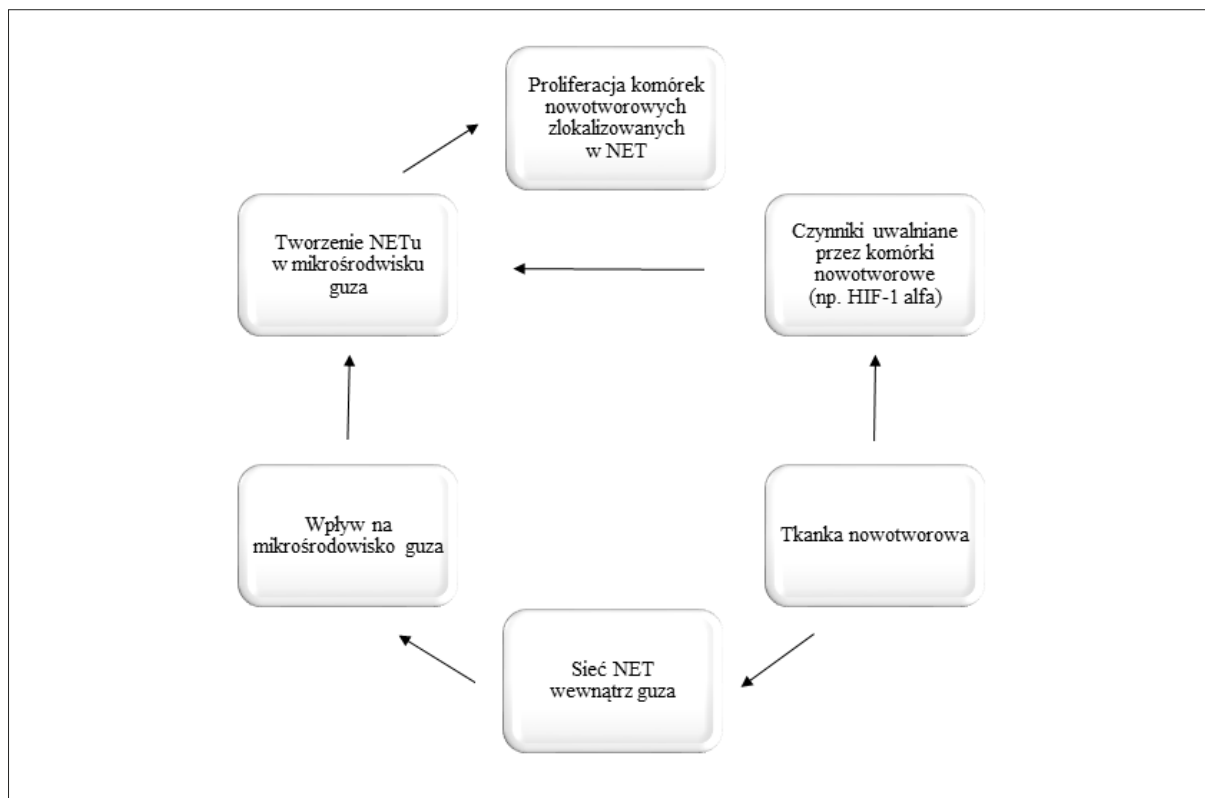
Neutrofile wiązane dotychczas przede wszystkim ze zwalczaniem patogenów chorobotwórczych oraz rozwojem reakcji zapalnych, mogą się okazać użyteczne w wykrywaniu, prognozowaniu (zarówno jako czynniki prognostyczne jak i predykcyjne) oraz monitorowaniu wielu typów nowotworów.

WYBRANE ASPEKTY PATOMECHANIZMU POWSTAWANIA PRZERZUTÓW NOWOTWOROWYCH

Najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych nowotworami złośliwymi są przerzuty odległe (około 90% chorych). Proces przerzutowania jest złożony i obejmuje: przeniknięcie komórek nowotworowych do wnętrza naczyń, przeżycie w krążeniu, ponowne pokonanie bariery naczyniowej w kierunku tkanek, przeżycie

i kolonizację w tkance odległej. Złożoność procesu powoduje, że ze stosunkowo dużej liczby komórek nowotworowych, które opuszczają miejsce powstania nowotworu ostatecznie nieliczne z nich mogą się przyczynić do powstania odległego ogniska przerzutowego. Mimo że powstanie przerzutów może być spowodowane migracją nawet pojedynczych komórek nowotworowych, to ich wykrywanie i zwalczanie w dalszym ciągu pozostaje ogromnym wyzwaniem dla współczesnej onkologii. W przebiegu większości nowotworów złośliwych rozwijają się ogniska przerzutowe, często o różnym umiejscowieniu, które zazwyczaj jest ściśle powiązane z typem nowotworu pierwotnego. Dostępne badania wskazują, że miejsce przerzutowania może być zdeterminowane odpowiednim wzorcem ekspresji określonych genów (profilem genetycznym) występującym w guzie pierwotnym [18,33]. Ponadto zmiany w mikrośrodowisku tkanek odległych spowodowane wpływem guza mogą uczynić je bardziej podatnymi na kolonizację lub migrację komórek nowotworowych. Potwierdzają to również niedawne badania sugerujące, że czynniki uwalniane z guza pierwotnego mogą bezpośrednio modulować potencjalne miejsce przerzutowe [11]. Dowiedziano ponadto, że pochodzące ze szpiku kostnego komórki mogą być przez guz pierwotny mobilizowane i kierowane do potencjalnego miejsca przerzutu, gdzie uczestniczą w formowaniu funkcjonalnej przedprzerzutowej niszy. Najprawdopodobniej wszystkie te procesy współdziałają w tworzeniu mikrośrodowiska sprzyjającego rozwojowi przyszłego ogniska przerzutowego [5,16].

Interakcje zachodzące między komórkami a mikrośrodowiskiem mają podstawowe znaczenie zarówno dla zachowania homeostazy w prawidłowej tkance, jak i wzrostu guza. Wpływają na inicjację choroby, progresję oraz rokowanie. Jako pierwszy na związek przewlekłego stanu zapalnego i nowotworzenia zwrócił uwagę Rudolf Virchow w 1863 r., który zaobserwował leukocyty naciekające guz [33,34]. Od tego czasu wielu badaczy podjęło się scharakteryzowania mikrośrodowiska guza oraz poszukiwania punktu uchwytu dla skutecznych terapii nowotworów. W skład typowego mikrośrodowiska nowotworu wchodzi fibroblasty, miofibroblasty, komórki tłuszczowe, neuroendokrynne, immunologiczne, pochodzące z układu krwionośnego i chłonnego oraz elementy macierzy pozakomórkowej (extracellular matrix, ECM). Obecność w mikrośrodowisku guza komórek immunologicznych, które zachowały zdolność hamowania rozwoju nowotworu koreluje z wydłużeniem czasu przeżycia chorych. Jeżeli jednak pod wpływem różnych czynników w danym mikrośrodowisku zajdzie transformacja nowotworowa może spowodować odwrócenie jego roli z hamującej na promującą rozwój guza. Jest to związane z przekształceniem, zrekrutowaniem lub takim zmodyfikowaniem zrębu danej tkanki aby pobudzone zostały synteza i uwalnianie wielu cytokin (w tym czynników wzrostu), chemokin oraz proteinaz, co ostatecznie prowadzi do znaczącej progresji choroby [5,16,34].



Ryc. 1. Schemat zależności między procesem NETozy, a rozwojem nowotworu

NET I JEGO ROLA W CHOROBYCH NOWOTWOROWYCH

Mimo że wpływ NETozy na proces nowotworowy pozostaje niewyjaśniony, wiadomo, że może oddziaływać na różne stadia rozwoju choroby, w tym wzrost guza, angiogenezę, przerzutowanie czy supresję układu immunologicznego. Zaobserwowano, że w pobliżu rozwijającego się guza, w miejscu akumulacji neutrofilów dochodzi do powstania NETu, co może wpływać na mikrośrodowisko nowotworu. W początkowym stadium rozwoju nowotworu granulocyty obojętnochłonne są umiejscowione dookoła guza (wykazując działanie przeciwnowotworowe, anti-tumoral neutrophils), podczas gdy w późniejszym stadium akumulują się wewnątrz rozwijającego się guza (wykazując działanie pronowotworowe, pro-tumoral neutrophils). Obecność sieci NET wewnątrz guza może sugerować udział tego procesu w pierwotnym wzroście nowotworu. Nie jest pewne czy rekrutacja neutrofilów i formowanie się NETu są spowodowane stanem zapalnym/hipoksją mikrośrodowiska guza czy proces ten jest odpowiedzialny za powstawanie obszarów nekrotycznych. Hipoksja powstała w obszarze guza może aktywować czynnik indukowany hipoksją 1 alfa (HIF-1 alfa), który stymuluje powstanie NETu. Czynnikiem ten wykazuje podwyższoną ekspresję w wielu nowotworach, wśród których należy wymienić raka trzustki, czerniaka, płuc, okrężnicy, żołądka czy prostaty [9]. Na rycinie 1 przedstawiono schemat zależności między procesem NETozy,

a rozwojem nowotworu. Dotąd przeprowadzono nieliczne badania naukowe, których wyniki wskazują na potencjalny związek między NETozą a progresją nowotworu. Wpływ NETozy na proces przerzutowania może być oceniany w kontekście funkcji pełnionych przez poszczególne komponenty sieci NET (m.in.: MMP-9, CG, NE). Prawdopodobnie komórki nowotworowe mogą być wychwytywane przez sieć NET z mikrośrodowiska w taki sam sposób jak mikroorganizmy. Jednak duże stężenie białek uwalnianych w czasie NETozy może indukować ich proliferację i hamować apoptozę, promując tym samym rozwój guza. Ponadto elementy sieci NET mogą przylegać do przerzutowych komórek nowotworowych i razem z rekrutowanymi płytkami krwi ograniczać reakcję systemu odpornościowego. Proces ten uniemożliwia ich wykrycie i zniszczenie, jednak mieloperoksydaza (myeloperoxidase, MPO), proteiny czy uwolnione przez neutrofile histony mogą hamować wzrost guza. Ponadto sieć NET jest rozpoznawana przez makrofagi oraz DCs. Po stymulacji makrofagi mogą do mikrośrodowiska wydzielać pro- lub przeciwzapalne cytokiny. Na podstawie doniesień można wyciągnąć wniosek, że niewłaściwa lub nadmierna NEToza jest związana z przewlekłym stanem zapalnym i uszkodzeniem tkanki. Przewlekły stan zapalny może doprowadzić do wzmożonej ekspresji cząsteczek adhezyjnych ułatwiających unieruchomienie komórek nowotworowych i interakcję z ECM. Ponadto obszar sieci NET może być bogaty w pronowotworowe białka i stworzyć „niszę

dla przerzutów” (pre-metastatic niche) oraz sprzyja powstaniu bardziej agresywnego fenotypu guza. Poniżej przedstawiono komponenty sieci NET potencjalnie istotne w procesie przerzutowania nowotworów [6,7,8,25,38].

Mieloperoxydaza

MPO jest lizosomalnym enzymem wytwarzanym przez granulocyty, szczególnie intensywnie we wczesnej fazie okresu ich dojrzewania. Katalizuje reakcje powstawania kwasu podchlorawego, który jest bardzo toksyczny w stosunku do wielu typów mikroorganizmów [10]. Wyniki wielu badań eksperymentalnych, klinicznych i epidemiologicznych wskazują, że przewlekły stan zapalny toczący się w jelicie może być jedną z przyczyn rozwoju raka jelita grubego. Prowadzone przez Roncucci i wsp. badania wykazały, że liczba komórek MPO-pozytywnych wzrasta w czasie transformacji nowotworowej błony śluzowej jelita grubego [30]. Autorzy sugerują możliwość wykorzystania markerów genetycznych (np. mikrosatelitarnego DNA) oraz stanu zapalnego (np. MPO) w ocenie ryzyka rozwoju raka jelita grubego [30]. Odajima i wsp. w eksperymentalnym modelu na myszach zaobserwowali, że MPO uszkadza komórki czerniaka przez co hamuje rozwój nowotworu [28]. Wyniki badań Rymaszewskiego i wsp. sugerują, że w fazie inicjacji oraz promocji nowotworu jest wymagana aktywność MPO [31]. W czasie jego progresji chroni komórki nowotworowe przed działaniem kaspazy-3 pośredniczącej w śmierci komórki. Profilaktyczne przyjmowanie inhibitora MPO przez pacjentów o podwyższonym ryzyku rozwoju raka płuca (np. chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, POChP) może zmniejszyć to ryzyko [31].

Kalprotektyna

Kalprotektyna (calprotectin) jest heterodimerycznym białkiem obficie występującym w cytosolu neutrofilii. Działa toksycznie na drobnoustroje oraz hamuje proliferację komórek nowotworowych. Wykazano, że reguluje przeżycie komórek ludzkiego raka prostaty poprzez surwiwinę, ROS i tlenek azotu (NO). Ponadto wykazano, że oznaczenie stężenia kalprotektyny w sposób czuły i swoisty odzwierciedla aktywność monocytów w pierwotnych zmianach nowotworowych oraz pozytywnie koreluje ze wzrostem guza. W badaniach *in vivo* u myszy z wszczepionym nowotworem anaplastycznego raka tarczycy oraz pozbawionych genu *S100A8* zaobserwowano obniżony wzrost nowotworu, przerzutów do płuc oraz istotnie wydłużony OS. Wykazano, że *S100A8* pobudza proliferację komórek ATC (activated T cell) przez interakcje z RAGE (receptor for advanced glycation end-products), który aktywuje sygnały p38ERK1/2 oraz JNK w komórkach guza. Kilka badań wykazało, że kalprotektyna jest czynnikiem chemotaktycznym mieloidalnych komórek progenitorowych. Podwyższone stężenie kalprotektyny przyczynia się do powstania przedprzerutowej niszy w mózgu i promuje przerzuty do płuc i wątroby [35].

Metaloproteinaza macierzy 9

MMP-9 wpływa na różne procesy pronowotworowe: hamuje apoptozę komórek nowotworowych, zwiększa ich proliferację, angiogenezę, inwazyjność oraz ułatwia tworzenie się przerzutów do narządów odległych. MMP-9 jest uwalniana w czasie NETozy przez neutrofile, bierze udział w procesie przedostawania się komórek nowotworowych z naczyń do ECM, biorąc tym samym udział w procesie angiogenezy. MMP-9 jest tak samo silnym czynnikiem proangiogennym jak VEGF i FGF2. Po uwolnieniu działa na sąsiadujące komórki epitelialne indukując rozbudowę naczyń. Huang i wsp. wykazali, że u myszy pozbawionych MMP-9, z ludzkim rakiem jajnika, sieć naczyń była słabiej rozwinięta w porównaniu do myszy, u których to białko było obecne [38]. Zaobserwowano, że u myszy (model RIP1-Tag2) z wszczepionym rakiem trzustki głównym źródłem MMP-9 były neutrofile, mimo że w mikrośrodowisku guza zdecydowanie przeważały makrofagi [38]. Autorzy zasugerowali, że MMP-9 uwalniane przez neutrofile odgrywają główną rolę w angiogenezie. Aktywność MMP-9 jest regulowana przez tkankowe inhibitory metaloproteinazy (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs), głównie TIMP-1. Utworzony kompleks MMP-9/TIMP-1 zabezpiecza tkanki przed niepożądaną aktywnością proteolityczną MMP-9. Neutrofile nie wytwarzają TIMP-1 i tym samym nie mogą uwolnić tego kompleksu. Pochodząca z niewydzielających TIMP neutrofilii MMP-9 pozwala na szybkie uwolnienie wielu zmagazynowanych czynników wzrostu, co umożliwia remodeling ECM w kierunku pobudzenia angiogenezy. Z tego względu obecność już kilku TAN w obrębie nowotworu jest wystarczająca do aktywacji procesów proangiogennych w modelach mysich (RIP1-Tag2) [38]. Masson i wsp. badali zależność poszczególnych MMP (-2, -3, -9) i ich zdolność do indukcji inwazyjności guza [23]. Autorzy doszli do wniosku, że u myszy pozbawionych MMP-2 i MMP-9 nie dochodziło do wzmoczonej angiogenezy. Natomiast w badaniach *in vitro* łączny brak MMP-2 i MMP-9 nie hamował odrastania naczyń kapilarnych od aorty. Wyniki wskazują na znaczenie wzajemnych interakcji między komórkami gospodarza w zakresie angiogennych i promujących rozwój guza wpływów MMP-2 i MMP-9. Zaprezentowane wyniki badań na eksperymentalnym modelu sugerują, że wspólne działanie MMP-2 i MMP-9 promuje *in vivo* inwazyjność oraz angiogenezę karotenocytów [22,23].

Białko BPI

Białko BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) jest naturalnie występującym składnikiem ziarnistości azurofilnych ludzkich neutrofilii. Ma właściwości bakteriobójcze względem bakterii Gram-ujemnych, neutralizuje skutki działania LPS oraz bierze udział w procesie gojenia ran [7,8,40]. Ponadto odgrywa rolę w utrzymaniu równowagi między czynnikami angiogennymi oraz angiostatycznymi [40].

Badania obejmujące przerzutowego raka jelita grubego wykazały, że może ono hamować angiogenezę i proces ten odbywa się w wyniku pobudzenia przez BPI apoptozy

komórek endotelialnych. W okresie okołoperacyjnym wiele czynników może indukować proces angiogenezy. Dodatkowa manipulacja chirurgiczna w obrębie zmiany nowotworowej może spowodować rozsiew komórek nowotworowych [37,39,46]. O'Donoghue i wsp. zaproponowali hipotezę, że wykorzystanie substancji przeciwendotoksykcyjnej (przeciw-LPS) - rekombinowanego białka BPI (rBPI) może zapobiec rozwojowi guza spowodowanego zabiegiem chirurgicznym [29]. Autorzy doszli do wniosku, że laparotomia zwiększa: potencjał przerzutowy, proliferację komórek nowotworowych, angiogenezę oraz ilość krążącego VEGF oraz hamuje apoptozę komórek nowotworowych. Zablokowanie LPS przez rBPI hamuje wzrost guza, proliferację, angiogenezę i ilość krążącego VEGF oraz wzrost apoptozy komórek nowotworowych. W związku z otrzymanymi wynikami autorzy pracy zasugerowali, że rBPI może hamować rozwój nowotworu, zwłaszcza u chorych, którzy przeszli laparotomię [29].

Kationowe proteazy serynowe

Głównym komponentem azurofilnych ziarnistości neutrofilii są kationowe proteazy serynowe (neutrophil serine proteases, NSPs): elastaza neutrofilii (neutrophil elastase, NE), proteinaza 3, katepsyna G, które uczestniczą w beztlenowym szlaku niszczenia zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowych patogenów. NSPs w połączeniu z mikrobójczymi peptydami oraz aktywną oksydazą NADPH trawią zfagocytowane przez neutrofile patogeny. NSPs odgrywają rolę nie tylko w niszczeniu patogenów, ale również regulują procesy zapalne m.in. toczące się w płucach. W ostatnim czasie podejmowane są próby wyjaśnienia ich roli w procesie nowotworowym [20].

Elastaza neutrofilii

Elastaza neutrofilii jest enzymem odpowiedzialnym za rozkład elastyny, odgrywa istotną rolę w regulacji przebiegu procesów zapalnych. Wielu badaczy wskazuje udział NE na różnych etapach, zarówno od promocji guza do powstania przerzutów w rozwoju procesu nowotworowego [15]. Potwierdzeniem powyższej tezy są badania, w których odnotowano istotny wpływ ludzkiej NE na proces przerzutowania w niedrobnokomórkowym raku płuca. Wykazano, że może działać w różnorodny sposób, m.in. wewnątrzkomórkowo: rozkładając molekułę adhezyjną - substrat dla receptora insulinowego (insulin receptor substrate-1, IRS-1), na powierzchni komórki: hydrolizując receptory np. CD40, w przestrzeni zewnątrzkomórkowej: przyczyniając się do wzrostu liczby fragmentów elastyny - morfoelastokin (potencjalnie stymulujących angiogenezę oraz inwazyjność komórek nowotworowych) [27]. Ponadto, odnotowano istotnie większą aktywność NE u pacjentów, u których wielkość guza przekraczała 5 cm lub zaobserwowano przerzuty do węzłów chłonnych w porównaniu do pozostałych chorych. Podobnie u pacjentek z rakiem piersi, u których stwierdzono dużą aktywność NE odnotowano istotnie krótsze przeżycia wolne od choroby w stosunku do tych z małą aktywnością tego enzymu [1]. Ilość immunoreaktywnej NE w tkance nowotworowej jest niezależnym czynnikiem pro-

gnostycznym w raku piersi oraz płuca. Ponadto w innych badaniach wykazano, że swoiste inhibitory NE całkowicie hamują wzrost komórek nowotworowych przeszczepionych myszom z niedoborami odporności. Zastosowanie tego typu inhibitorów wydaje się obiecującym sposobem na zapobieganie naciekom oraz przerzutom nowotworowym [32].

Katepsyna G

Katepsyna G odgrywa ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej, apoptozie, chemotaksji oraz koagulacji krwi. Jej funkcja w procesie nowotworowym nie jest wyjaśniona [25]. Kudo i wsp wykazali, że katepsyna G zwiększa siłę zależnej od stężenia E-kadheryny adhezji międzykomórkowej w komórkach raka piersi (MCF-7) [21]. Autorzy sugerują, że neutrofile naciekające guz dzięki właściwościom katepsyny G mogą mieć wpływ na rozwój nowotworu i przerzutowanie [21]. Wilson i wsp wykazali, że inhibicja funkcji katepsyny G prowadzi do hamowania szlaku przekazywania pochodzącego z TGF- β i zależnego od obniżenia ekspresji MCP-1 oraz VEGF zmniejszenia unaczynienia guza. Autorzy uważają, że katepsyna G może być potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu zmian osteolitycznych indukowanych rakiem piersi [44].

Proteinaza 3

W linii komórkowej HL-60 zablokowanie PR3 zahamowało proliferację i różnicowanie komórek białaczki promielocytowej. Podobnie jak w przypadku NE nadekspresja PR3 wpływa na funkcjonowanie wielu wewnątrzkomórkowych białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego i różnicowanie. Wykazano m.in., że nieswoiste hamowanie protez serynowych w raku piersi (MCF-7) wykazującym nadekspresję PR3 powoduje zahamowanie proliferacji i pobudza różnicowanie komórek [45]. Staquicini i wsp wykazali, że RAGE i PR3 mają związek z nowotworzeniem oraz przerzutami [36]. Kompleks RAGE i PR-3 pośredniczyły w tworzeniu przerzutów raka prostaty do szpiku kostnego. Uważano, że białka te są aktywne w niezależnych od siebie ścieżkach i różnią się od siebie pod względem funkcjonalnym. Autorzy sugerują, że PR-3 może mieć istotne znaczenie w powstawaniu nowotworów swoistych szpikowo oraz procesie przerzutowania [36].

PODSUMOWANIE

Dotychczasowe wiadomości nie pozwalają na jednoznaczne określenie roli NETozy w rozwoju oraz progresji nowotworu. Prawdopodobnie skutek działania NETozy zależy od wielu czynników m.in. stanu układu immunologicznego czy mikrośrodowiska guza. Prowadzone badania naukowe mogą dostarczyć cennych informacji, które mogłyby zostać wykorzystane w praktyce klinicznej. Lepsze zrozumienie funkcji NETozy w progresji nowotworu może spowodować pojawienie się nowych czynników prognostycznych oraz punktów uchwytu dla terapii w wielu typach nowotworów.

PISMIENICTWO

- [1] Akizuki M., Fukutomi T., Takasugi M., Takahashi S., Sato T., Harao M., Mizumoto T., Yamashita J.: Prognostic significance of immunoreactive neutrophil elastase in human breast cancer: long-term follow-up results in 313 patients. *Neoplasia*, 2007; 9: 260-264
- [2] Benito-Martin A., Di Giannatale A., Ceder S., Peinado H.: The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression. *Front Immunol.*, 2015; 6: 66
- [3] Brinkmann V., Laube B., Abu Abed U., Goosmann C., Zychlinsky A.: Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J. Vis. Exp.*, 2010; 36: 1724
- [4] Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004; 303: 1532-1535
- [5] Chen F., Zhuang X., Lin L., Yu P., Wang Y., Shi Y., Hu G., Sun Y.: New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.*, 2015; 13: 45
- [6] Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., Gowing S., Chow S., Giannias B., Bourdeau F., Kubes P., Ferri L.: Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.*, 2013; 123: 3446-3458
- [7] Cools-Lartigue J., Spicer J., Najmeh S., Ferri L.: Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014; 71: 4179-4194
- [8] Demers M., Wagner D.D.: NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Semin Thromb Hemost.*, 2014; 40: 277-283
- [9] Demers M., Wagner D.D.: Neutrophil extracellular traps: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression. *Oncoimmunology*, 2013; 2: e22946
- [10] Droeser R.A., Hirt C., Eppenberger-Castori S., Zlobec I., Viehl C.T., Frey D.M., Nebiker C.A., Rosso R., Zuber M., Amicarella F., Iezzi G., Sconocchia G., Heberer M., Lugli A., Tornillo L. i wsp.: High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS One*, 2013; 8: e64814
- [11] Erler J.T., Bennewit K.L., Cox T.R., Lang G., Bird D., Koong A., Le Q.T., Giaccia A.J.: Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell.*, 2009; 15: 35-44
- [12] Fridlender Z.G., Albelda S.M.: Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*, 2012; 33: 949-955
- [13] Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A.: Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell. Biol.*, 2007; 176: 231-241
- [14] Golbach L.A., Scheer M.H., Cuppen J.J., Savelkoul H., Verburg-van Kemenade B.M.: Low-frequency electromagnetic field exposure enhances extracellular trap formation by human neutrophils through the NADPH pathway. *J. Innate Immun.*, 2015; 7: 459-465
- [15] Gong L., Cumpian A.M., Caetano M.S., Ochoa C.E., De la Garza M.M., Lapid D.J., Mirabolfathinejad S.G., Dickey B.F., Zhou Q., Moghaddam S.J.: Promoting effect of neutrophils on lung tumorigenesis is mediated by CXCR2 and neutrophil elastase. *Mol. Cancer*, 2013; 12: 154
- [16] Granot Z., Henke E., Comen E.A., King T.A., Norton L., Benezra R.: Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell.*, 2011; 20: 300-314
- [17] Gregory A.D., Houghton A.M.: Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.*, 2011; 71: 2411-2416
- [18] Gupta G.P., Massagué J.: Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 2006; 127: 679-695
- [19] Itagaki K., Kaczmarek E., Lee Y.T., Tang I.T., Isal B., Adibnia Y., Sandler N., Grimm M.J., Segal B.H., Otterbein L.E., Hauser C.J.: Mitochondrial DNA released by trauma induces neutrophil extracellular traps. *PLoS One*, 2015; 10: e0120549
- [20] Korkmaz B., Horwitz M.S., Jenne D.E., Gauthier F.: Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol. Rev.*, 2010; 62: 726-759
- [21] Kudo T., Kigoshi H., Hagiwara T., Takino T., Yamazaki M., Yui S.: Cathepsin G, a neutrophil protease, induces compact cell-cell adhesion in MCF-7 human breast cancer cells. *Mediators Inflamm.*, 2009; 2009: 850940
- [22] López-Lago M.A., Posner S., Thodima V.J., Molina A.M., Motzer R.J., Chaganti R.S.: Neutrophil chemokines secreted by tumor cells mount a lung antimetastatic response during renal cell carcinoma progression. *Oncogene*, 2013; 32: 1752-1760
- [23] Masson V., de la Ballina L.R., Munaut C., Wielockx B., Jost M., Maillard C., Blacher S., Bajou K., Itoh T., Itoharu S., Werb Z., Libert C., Foidart J.M., Noël A.: Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J.*, 2005; 19: 234-236
- [24] Matuszka N., Działo J., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: NET i NEToza – nowe zjawisko w immunologii. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 437-445
- [25] Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A.: The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.*, 2014; 9: 181-218
- [26] Morimoto-Kamata R., Mizoguchi S., Ichisugi T., Yui S.: Cathepsin G induces cell aggregation of human breast cancer MCF-7 cells via a 2-step mechanism: catalytic site-independent binding to the cell surface and enzymatic activity-dependent induction of the cell aggregation. *Mediators Inflamm.*, 2012; 2012: 456462
- [27] Moroy G., Alix A.J., Sapi J., Hornebeck W., Bourguet E.: Neutrophil elastase as a target in lung cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2012; 12: 565-579
- [28] Odajima T., Onishi M., Hayama E., Motoji N., Momose Y., Shigematsu A.: Cytolysis of B-16 melanoma tumor cells mediated by the myeloperoxidase and lactoperoxidase systems. *Biol. Chem.*, 1996; 377: 689-693
- [29] O'Donoghue G.T., Pidgeon G.P., Harmeey J.H., Dedrick R., Redmond H.P., Bouchier-Hayes D.J.: Recombinant bactericidal permeability increasing protein (rBPI21) inhibits surgery-induced tumour growth in a murine model of metastatic disease. *Ir. J. Med. Sci.*, 2008; 177: 359-365
- [30] Roncucci L., Mora E., Mariani F., Bursi S., Pezzi A., Rossi G., Pedroni M., Luppi D., Santoro L., Monni S., Manenti A., Bertani A., Merighi A., Benatti P., Di Gregorio C., de Leon P.M.: Myeloperoxidase-positive cell infiltration in colorectal carcinogenesis as indicator of colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev.*, 2008; 17: 2291-2297
- [31] Rymaszewski A.L., Tate E., Yimbessalu J.P., Gelman A.E., Jarzembowski J.A., Zhang H., Pritchard K.A. Jr, Vikis H.G.: The role of neutrophil myeloperoxidase in models of lung tumor development. *Cancers*, 2014; 6: 1111-1127
- [32] Sato T., Takahashi S., Mizumoto T., Harao M., Akizuki M., Takasugi M., Fukutomi T., Yamashita J.: Neutrophil elastase and cancer. *Surg. Oncol.*, 2006; 15: 217-222
- [33] Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J.: Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 2011; 331: 1565-1570
- [34] Smith H.A., Kang Y.: The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J. Mol. Med.*, 2013; 91: 411-429

- [35] Srikrishna G.: S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J. Innate Immun.*, 2012; 4: 31-40
- [36] Staquicini F.I., Cardó-Vila M., Kolonin M.G., Trepel M., Edwards J.K., Nunes D.N., Sergeeva A., Efstathiou E., Sun J., Almeida N.F., Tu S.M., Botz G.H., Wallace M.J., O'Connell D.J., Krajewski S. i wsp.: Vascular ligand-receptor mapping by direct combinatorial selection in cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 18637-18642
- [37] Stockmann C., Schadendorf D., Klose R., Helfrich I.: The impact of the immune system on tumor: angiogenesis and vascular remodeling. *Front. Oncol.*, 2014; 4: 69
- [38] Tazzyman S., Niaz H., Murdoch C.: Neutrophil-mediated tumour angiogenesis: subversion of immune responses to promote tumour growth. *Semin. Cancer Biol.*, 2013; 23: 149-158
- [39] van der Schaft D.W., Toebes E.A., Haseman J.R., Mayo K.H., Griffioen A.W.: Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) inhibits angiogenesis via induction of apoptosis in vascular endothelial cells. *Blood*, 2000; 96: 176-181
- [40] van der Schaft D.W., Wagstaff J., Mayo K.H., Griffioen A.W.: The antiangiogenic properties of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI). *Ann. Med.*, 2002; 34: 19-27
- [41] Vesely M.D., Schreiber R.D.: Cancer immunoeediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2013; 1284: 1-5
- [42] Webber J., Yeung V., Clayton A.: Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2015; 40: 27-34
- [43] Weis S.M., Cheresh D.A.: Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat. Med.*, 2011; 17: 1359-1370
- [44] Wilson T.J., Nannuru K.C., Futakuchi M., Singh R.K.: Cathepsin G-mediated enhanced TGF- β signaling promotes angiogenesis via upregulation of VEGF and MCP-1. *Cancer Lett.*, 2010; 288: 162-169
- [45] Witko-Sarsat V., Canteloup S., Durant S., Desdouets C., Chabernaud R., Lemarchand P., Descamps-Latscha B.: Cleavage of p21^{waf1} by proteinase-3, a myeloid-specific serine protease, potentiates cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 47338-47347
- [46] Wu F.P., Boelens P.G., van Leeuwen P.A., Hoekman K., Hansma A.H., Wiezer M.J., Meijer C., Meijer S., Scotté M., Cuesta M.A.: Effects of major liver resection, with or without recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI₂₁), on the angiogenic profile of patients with metastatic colorectal carcinoma. *J. Surg. Oncol.*, 2003; 84: 137-142

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.