

ПРОДУКЦИЯ ГРАНЗИМА В ЛИМФОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ В КО-КУЛЬТУРЕ С КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИЕЙ K562

*Назаренко Е. М.^{1,2}, Нижегородова Д. Б.^{2,1}, Морозова Н.А.³, Иванчик Г. И.²,
Колядич Ж.В.³, Зафранская М. М.^{1,2}*

¹*Учреждение образования «Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета,
г. Минск, Республика Беларусь;*

²*НИИ экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного
медицинского университета, Минский р-н, аг. Лесной, Республика Беларусь;*

³*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»,
Минский р-н, аг. Лесной, Республика Беларусь*

Реферат. Одним из перспективных направлений оценки степени и динамики развития новообразований является характеристика молекулярных маркеров, связанных с противоопухолевой активностью иммунной системы. В статье представлены результаты анализа уровня внеклеточной продукции гранзима В лимфоидными клетками пациентов с доброкачественными и злокачественными синоназальными новообразованиями, полипозным риносинуситом в совместных культурах с опухолевой клеточной линией K562. Выявлено сниженное содержание внеклеточного гранзима В в ко-культурах лимфоидных клеток пациентов со злокачественными новообразованиями относительно других исследуемых групп, что может свидетельствовать о нарушении механизмов цитотоксичности и быть использовано в качестве прогностического маркера малигнизации опухолевого процесса.

Ключевые слова: клеточная цитотоксичность, лимфоидные клетки, гранзим В, новообразования, клеточная линия K562.

Введение. Доброкачественные и злокачественные синоназальные новообразования представляют собой гетерогенную группу опухолей, возникающих из поверхностей слизистых

оболочек полости носа и рта, ротоглотки и гортани. В начале своего развития заболевания носят бессимптомный характер или проявляются незначительными неспецифическими признаками, что затрудняет своевременную диагностику патологий.

Среди доброкачественных синоназальных новообразований большая часть приходится на инвертированную папиллому (ИП), которая преимущественно возникает у людей старше 50 лет и обычно диагностируется на поздней стадии, через 1–4 года после первого появления синоназальных симптомов. Отмечают следующие характеристики, отличающие ИП от других опухолей придаточных пазух носа: относительно высокий потенциал местной деструкции костей черепа, высокая частота рецидивов и риск злокачественной трансформации, который колеблется в пределах от 5 до 15 % [1].

Плоскоклеточный рак головы и шеи представляет собой наиболее частое злокачественное новообразование, возникающее в области верхних дыхательных путей, и является шестым по распространенности раком в мире. Заболевание оказывает серьезное влияние на качество жизни пациентов, что обусловлено, главным образом, относительно низкой реакцией на лечение и выраженной лекарственной устойчивостью. Выживаемость по-прежнему остается очень низкой, поскольку у 25 % пациентов наблюдается метастазирование в течение первых 5 лет после постановки диагноза [2].

Этиология злокачественных и доброкачественных синоназальных новообразований остается малоизученной, хотя определенные факторы, такие как курение, употребление алкоголя, аллергии или определенные профессиональные воздействия могут влиять на развитие и течение заболевания. В 40 % случаев сообщается о связи заболеваний с вирусом папилломы человека (ВПЧ), что предполагает причастность вируса к патогенезу. При этом серотипы ВПЧ 6 и 11 чаще обнаруживаются при доброкачественной ИП, а серотипы 16 и 18 (с высоким онкогенным риском) – при ИП с ассоциированной дисплазией или карциномой высокой степени [1, 2]. Несмотря на значительные достижения в области биотехнологии, разработки лекарств, роботизированной хирургии и подходов лучевой терапии, результаты терапии синоназальных новообразований остаются в основном неизменными в течение последних нескольких десятилетий [2].

Клеточная цитотоксичность является важным эффекторным механизмом лимфоидных клеток в борьбе с инфицированными и

трансформированными клетками организма. Уничтожение клеток-мишеней осуществляют преимущественно цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры (NK-клетки). Цитотоксические лимфоидные клетки могут вызывать цитолиз опухолевых клеток посредством направленного высвобождения литических гранул (содержащих перфорин, гранзимы, гранулин, кателицидин и др.) или путем индукции апоптоза, опосредованного рецепторами смерти, путем экспрессии FasL (CD95L) и лиганда, индуцирующий апоптоз, связанный с TNF (TRAIL). Взаимодействие этих лигандов с Fas (CD95) и TRAIL-R1/-R2 соответственно на клетках-мишенях могут запускать сходный проапоптотический каскад сигналов. Считается, что грануло-медицированный киллинг является основным механизмом цитотоксичности лимфоидных клеток, поскольку для его реализации требуется меньше времени по сравнению с апоптозом, опосредованным рецепторами смерти. Литические гранулы представляют собой специализированную подгруппу лизосом, которая содержит как лизосомальные, так и секреторные белки, включая перфорин и гранзимы, являющиеся сериновыми протеазами. Считается, что перфорин встраивается в мембрану трансформированных или инфицированных клеток и работает как канал, обеспечивающий проникновение гранзимов в цитоплазму клеток-мишеней.

Показано, что из всех гранзимов, охарактеризованных на сегодняшний день, только гранзим В в сочетании с перфорином одновременно необходим и достаточен для индукции апоптоза в опухолевых клетках [3].

Цель работы – оценка продукции внеклеточного гранзима В лимфоидными клетками периферической крови у пациентов с полипозным риносинуситом, инвертированной папилломой и злокачественными новообразованиями полости носа и околоносовых пазух в ко-культуре с опухолевой линией клеток K562.

Материалы и методы. В качестве клеточных эффекторов использовали мононуклеары периферической крови (МПК), полученные из венозной крови 20 пациентов (10 мужчин и 10 женщин, средний возраст – 61,5 (48,5 ÷ 73,8) лет), среди которых 8 пациентов со злокачественными синоназальными новообразованиями, 6 пациентов с ИП, 6 пациентов с полипозным риносинуситом и 6 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу. Забор биологического материала осуществлялся после получения информированного согласия на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен локальными этическими

комитетами учреждений здравоохранения. МПК выделяли с помощью центрифугирования разведенной в физиологическом растворе периферической крови на градиенте плотности Roti@Sep 1077 (Carl Roth, Германия). В качестве клеток-мишеней использовали суспензионную клеточную линию K562 в логарифмической фазе роста.

Совместное культивирование МПК и клеточной линии K562 (1×10^4 клеток на лунку) проводили в соотношении эффектор : мишень (E : T) 6,25 : 1 в культуральной среде RPMI-1640 (Sigma, Германия) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки, 1%-ного антибиотика-антимикотика (Gibco, США) и 1%-ного L-глутамина (Gibco, Великобритания) в течение 3 дней при 37 °C с 5%-ным CO₂. В качестве контролей использовали монокультуры K562 (1×10^4 клеток на лунку) и МПК ($6,25 \times 10^4$ клеток на лунку).

Для оценки жизнеспособности клеток-мишеней культуру K562 перед культивированием окрашивали флуоресцентным красителем карбоксифлуоресцеином (CFSE, Sigma, Германия) в концентрации 7 мМ, а по окончании культивирования в пробы добавляли пропидий йодид (Elabscience Biotechnology, Китай). Регистрацию результатов выполняли на 10000 клеток K562 в пробе с использованием проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США). В качестве положительного контроля клеточной гибели использовали K562, преинкубированные с этанолом (96 %) в течение 20 минут.

Концентрацию гранзима В в супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя с использованием коммерческого набора Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit (Elabscience Biotechnology, Китай). Чувствительность набора составила 9,38 пг/мл. Результаты регистрировали на микропланшетном фотометре «Sunrise» (Tecan, Австрия) при $\lambda=450$ нм.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0. Использовались показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей (25-й процентиль ÷ 75-й процентиль). Сравнение групп и определение статистической значимости различий осуществлялось непараметрическим W-критерием Вилкоксона для зависимых и U-критерием Манна–Уитни для независимых переменных. Корреляционный анализ выполняли по Спирмену. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования установлено, что совместное культивирование МПК как здоровых доноров, так и

пациентов исследуемых групп с опухолевой клеточной линией K562 приводило к статистически значимому увеличению содержания в супернатантах гранзима В по сравнению с монокультурами. При этом уровень внеклеточного гранзима В при спонтанной цитотоксичности у пациентов со злокачественными синоназальными новообразованиями (0 (0 ÷ 1,6) пг/мл, рисунок 1, а) был снижен относительно пациентов с ИП (4,6 (0 ÷ 66,1) пг/мл, $p=0,05$, рисунок 1, б) и контрольной группой (52,2 (2,3 ÷ 140,1) пг/мл, $p=0,01$, рисунок 1, в), пациентов с полипозным риносинуситом (4,5 (0 ÷ 10,7) пг/мл, $p=0,08$, рисунок 1, г). В совместных культурах лимфоидных клеток пациентов со злокачественными опухолями с K562 также наблюдалась сниженная концентрация внеклеточного гранзима В (56,8 (1,5 ÷ 278,1) пг/мл, рисунок 1, а) по отношению к ко-культурам группы ИП (395,8 (130 ÷ 422,4) пг/мл, $p=0,02$, рисунок 1, б), пациентов с полипозным риносинуситом (189,5 (6,3 ÷ 405,5) пг/мл, рисунок 1, в) и доноров (320,3 (45,4 ÷ 658,6) пг/мл, $p=0,03$, рисунок 1, г). Соответственно, стимуляция продукции гранзима В в совместных культурах с K562 по сравнению со спонтанной цитотоксичностью осуществлялась во всех исследуемых группах, однако у пациентов со злокачественными новообразованиями уровни гранзима В были значительно снижены по сравнению с пациентами с ИП и здоровыми донорами.

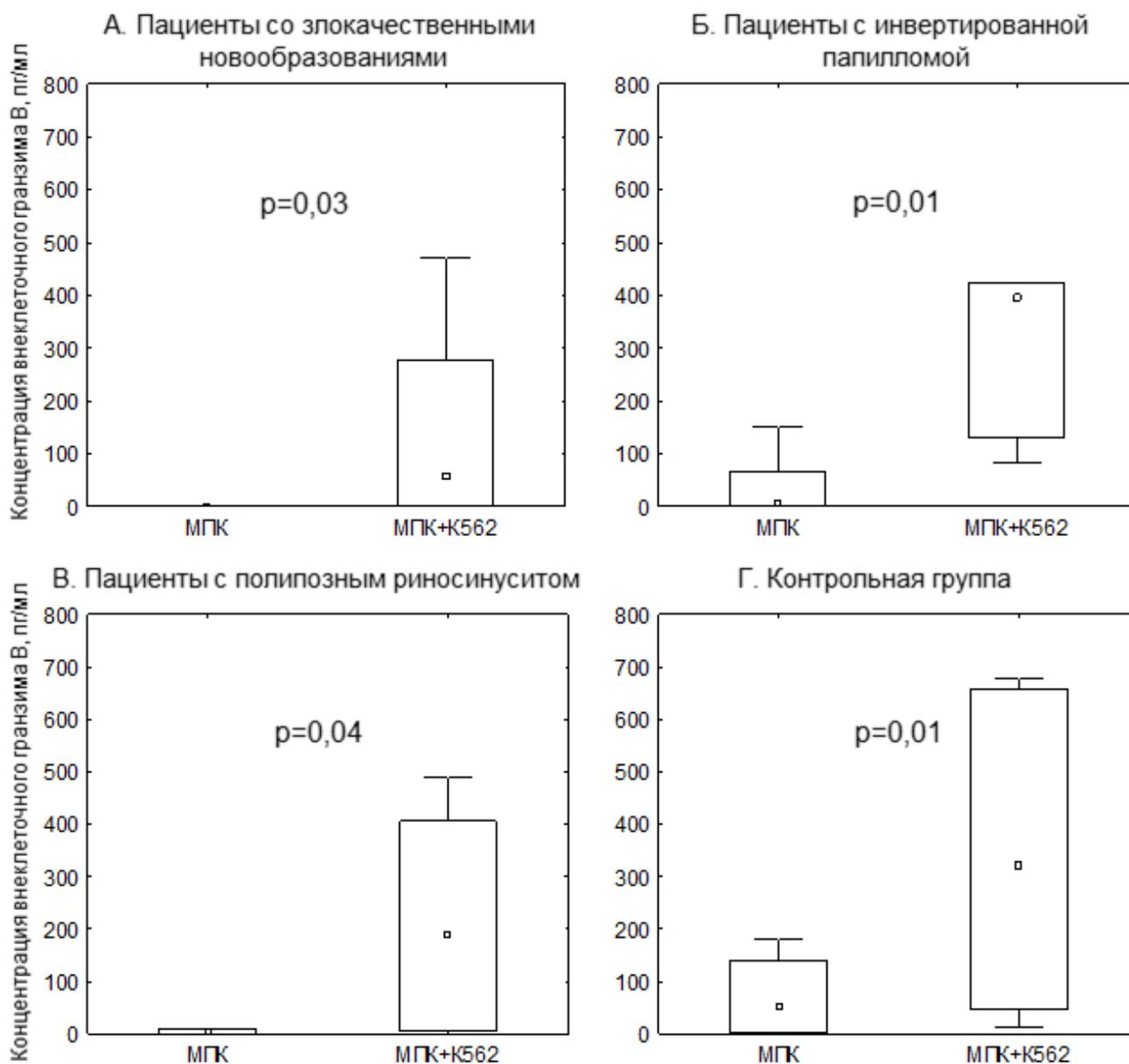
Выявлена связь между степенью злокачественности заболевания и содержанием в контрольных ($R=-0,4$; $p=0,01$) и совместных с K562 ($R=-0,3$; $p=0,05$) культурах внеклеточного гранзима В.

В дополнение в этому, показана связь между установленным диагнозом и значениями клеточной гибели культуры K562 при совместном культивировании с эффекторными клетками ($R=-0,6$; $p=0,04$). Однако статистически значимой корреляции между уровнями внеклеточной продукции гранзима В и гибелью клеток-мишеней не установлено.

Такой результат может подтверждать недавние данные о том, что экспрессия гранзима В не всегда положительно коррелирует с противоопухолевой эффективностью. Некоторые исследователи установили, что мыши с дефицитом гранзима В продемонстрировали лучшую способность к уничтожению как аллогенных, так и сингенных опухолевых клеток, чем мыши дикого типа [4]. Согласно литературным данным повышенная экспрессия гранзима В в опухолевом микроокружении связана с благоприятным

прогнозом при цервикальной интраэпителиальной неоплазии, кожном плоскоклеточном раке, колоректальном раке и меланоме. С другой стороны, высокая экспрессия коррелирует с плохим клиническим исходом у пациентов с карциномами шейки матки и носоглотки, что

свидетельствует о неоднозначности имеющихся данных относительно роли гранзима В при злокачественных новообразованиях, которая может зависеть от локального микроокружения опухоли [5].



Примечание: МПК – мононуклеары периферической крови,
 □ Медиана, □ 25%-75%, I Диапазон без выбросов

Рисунок 1 – Уровни внеклеточного гранзима В (пг/мл) в монокультуре МПК и ко-культуре с K562 исследуемых групп:

А – пациенты со злокачественными новообразованиями;

Б – пациенты с инвертированной папилломой;

В – пациенты с полипозным риносинуситом;

Г – контрольная группа

Гранзим В представляет собой сериновую протеазу, обладающую широкой субстратной специфичностью с преимущественным расщеплением остатков аспарагиновой кислоты. Белок экспрессируется в виде зимогена, который содержит ингибирующий дипептид и N-концевой сигнальный пептид, направляющий его в эндоплазматический ретикулум, а затем отщепляется. Для попадания в литические гранулы неактивный профермент модифицируется путем присоединения фрагмента маннозо-6-фосфата (М6Р) в части комплекса Гольджи, что обеспечивает дальнейшее перемещение белка к гранулам за счет рецептора М6Р. Внутри секреторных гранул остаток М6Р может как удаляться благодаря кислотной среде (рН-5,5), так и сохраняться. Переход в активную форму сопровождается отщеплением ингибирующего дипептида цистеиновыми протеазами катепсином С или катепсином Н. Активность гранзима В внутри литических гранул впоследствии ингибируется низким рН и связыванием с хондроитинсульфатным протеогликаном серглицином, предотвращая расщепление собственных белков клетки [3].

Исследования *in vitro* показали, что гранзим В индуцирует гибель клеток-мишеней двумя основными механизмами. Первый включает протеолитическую активацию каспазы-3 и каспазы-7 в клетке-мишени, что вызывает каспазозависимую гибель клеток путем расщепления различных клеточных субстратов, включая ряд структурных и регуляторных белков в ядре, цитозоле и цитоскелете. Другой механизм связан с пермеабиллизацией внешней мембраны митохондрий посредством расщепления проапоптотического белка Bid. В дополнение к этому гранзим В также способен усиливать провоспалительные реакции

за счет расщепления про-интерлейкина-18 и интерлейкина-1 α . Хотя гранзим В селективен в отношении консервативных аминокислотных последовательностей своих субстратов, его цитотоксичность неспецифична для опухолевых клеток, что позволяет предположить, что гранзим В в активной форме, особенно той, которая высвобождается во внеклеточное пространство, может нанести вред обеим сторонам иммунного ответа в микроокружении опухоли [4]. На данный момент обнаружено, что, хотя цитотоксические Т- и НК-клетки являются преобладающими типами клеток, вырабатывающих гранзим В, многие другие неиммунные и иммунные клетки, включая Т-регуляторные (Tregs), В-регуляторные (Bregs) и плазматоцитодные дендритные клетки (pDC) могут продуцировать и секретировать этот фермент для иммуносупрессивных целей. Поэтому установление особенностей сетей регуляции экспрессии и секреции гранзима В является перспективным направлением для дальнейшего углубления понимания взаимодействия иммунной системы с опухолевыми клетками.

Заключение. Таким образом, лимфоидные клетки пациентов всех исследуемых групп реагируют увеличением внеклеточной продукции гранзима В при совместном культивировании с опухолевой клеточной линией K562, однако уровень синтеза у пациентов со злокачественными синоназальными новообразованиями статистически значимо снижен как относительно пациентов с ИП, так и здоровых лиц, что может свидетельствовать о нарушении механизмов контактной цитотоксичности в противоопухолевой защите в патогенезе плоскоклеточного рака слизистых оболочек.

Список цитированных источников

1. Lisan, Q. Sinonasal inverted papilloma: From diagnosis to treatment / Q. Lisan, O. Laccourreye, P. Bonfils // *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*. – 2016. – Vol. 133, N 5. – P. 337–341.
2. Peltanova, B. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review / B. Peltanova, M. Raudenska, M. Masarik // *Mol Cancer*. – 2019. – Vol. 18, N 1. – 24 p.
3. Prager, I. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity / I. Prager, C. Watzl // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2019. – Vol. 105, N 6. – P. 1319–1329.
4. Interaction Networks Converging on Immunosuppressive Roles of Granzyme B: Special Niches Within the Tumor Microenvironment / W. Wang [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12 – 14 p.
5. The clinicopathological significance of the expression of Granzyme B in oral squamous cell carcinoma / N. L. Costa [et al.] // *Oral Oncology*. – 2010. – Vol. 46, N 3. – P. 185–189.



Granzyme B production in co-culture of lymphoid cells and K562 cell line

*Nazaranka E. M.^{1,2}, Nizheharodava D. B.^{1,2}, Marozava N. A.³, Ivanchyk H. I.²,
Kolyadich J. V.³, Zafranskaya M. M.^{1,2}*

*¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University,
Minsk, Republic of Belarus;*

*²Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, of Belarusian State Medical University,
Minsk District, Lesnoy, Republic of Belarus;*

*³N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus,
Minsk District, Lesnoy, Republic of Belarus*

One of the promising directions for assessing the levels and dynamics of tumor development is the characterization of molecular markers associated with the antitumor activity of the immune system. The article presents the results of granzyme B extracellular production by lymphoid cells of patients with benign and malignant sinonasal neoplasms, polypous rhinosinusitis in co-cultures with the K562 tumor cell line. A reduced content of extracellular granzyme B in co-cultures of lymphoid cells of patients with malignant neoplasms relative to other study groups was revealed which may reflect the disturbance of cytotoxicity mechanisms and can be used as a prognostic marker of tumor process malignisation.

Keywords: cell-mediated cytotoxicity, lymphoid cells, granzyme B, neoplasms, K562 cell line.