

ЭКСПРЕССИЯ CD16 НА РЕЗИДЕНТНЫХ И ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ У ПАЦИЕНТОВ С СИНОНАЗАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ

CD16 EXPRESSION ON RESIDENT AND CIRCULATING LYMPHOID CELLS IN PATIENTS WITH SINONASAL TUMOURS

**А. А. Страх¹, Д. Б. Нижегородова^{1,2}, Н. А. Морозова³,
М. И. Ванслав², М. М. Зафранская^{1,2}**

**A. A. Strakh¹, D. B. Nizheharodava^{1,2}, N. A. Marozava^{1,2},
M. I. Vanslau², M. M. Zafranskaya^{1,2}**

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
г. Минск, Республика Беларусь,
alenastrakh2003@gmail.com, kaf_immunal@iseu.by

²НИИ экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета, НИИ ЭКМ БГМУ, Минск, Республика Беларусь

³Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н. Н. Александрова, РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова,
Минский район, а/г Лесной, Республика Беларусь

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU,
Minsk, Republic of Belarus

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

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

В данном исследовании у пациентов с синоназальными опухолями обнаружена взаимосвязь экспрессии CD16+ (FCγR3) на резидентных и циркулирующих лимфоидных клетках, что указывает на вовлечение механизмов антителозависимой клеточной цитотоксичности в патогенезе опухолевого процесса, и может быть использовано как прогностический биомаркер вероятности малигнизации.

In this study, patients with sinonasal tumors the correlation of CD16+ (FCγR3) expression on resident and circulating lymphoid cells was found, which indicates the involvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanisms in the pathogenesis of tumors process and can be used as a prognostic biomarker of malignancy probability.

Ключевые слова: синоназальные опухоли, антителозависимая клеточная цитотоксичность, CD16 рецептор, лимфоциты.

Keywords: sinonasal tumors, antibody-dependent cellular cytotoxicity, CD16 receptor, lymphocytes.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-184-187>

Введение. Синоназальные опухоли вследствие различных клинических проявлений, характера роста и отмечаемого потенциала агрессивности представляют собой серьезную медицинскую проблему, требующую внимания и дальнейших исследований. Опухоли синоназальной области представляют собой разнообразную группу опухолей, включающую как доброкачественные, так и злокачественные образования, поражающих полость носа, околоносовые пазухи, структуры передней и средней черепных ямок основания черепа [1]. К факторам,

способствующим возникновению злокачественных новообразований в синоназальной области, можно отнести различные хронические воспалительные процессы, наследственность, воздействие канцерогенов, вирусные инфекции, радиационное воздействие, профессиональные вредности и др. Воздействие данных триггеров может играть ключевую роль в развитии синоназальных опухолевых образований, среди которых полипозный риносинусит и инвертированная папиллома входят в группу наиболее часто диагностированных среди пациентов. Полипозный риносинусит и инвертированная папиллома, как наиболее часто диагностированное заболевание среди пациентов возрастной категории 50-60 лет, которые под воздействием данных триггеров склонны приводить к злокачественным новообразованиям.

Полипозный риносинусит (ПРС) – хроническое воспаление слизистой оболочки носа и околоносовых пазух, сопровождающееся рецидивирующим ростом полипов и характеризующееся высокой распространенностью. Помимо изучения различных этиологических факторов, их взаимосвязи и роли в патогенезе носовых полипов, рассматривается ПРС и как иммунный процесс, в возникновении которого играет роль вялотекущее воспаление в полости носа и придаточных пазухах, приводящее к изменению антигенной структуры слизистой оболочки на фоне сниженной местной иммунологической реактивности организма [2].

Инвертированная папиллома (ИП) относится к доброкачественным опухолям и гистологически характеризуется инвагинацией покровного эпителия в подлежащую строму. Этиология инвертированной папилломы до сих пор неизвестна, но многочисленные исследования ключевым этиологическим и патогенетическим фактором, запускающим рост ИП, указывают вирус папилломы человека (ВПЧ) – 6-го, 11-го, 16-го и 18-го подтипов вируса [3].

Постановка диагноза и точная дифференциация между различными опухолями синоназальной области на ранних стадиях формирования может быть затруднительной только на основе анамнеза пациента, лабораторной и инструментальной диагностики. Таким образом, необходимо осуществлять диагностику на основании дополнительных гистологических и иммунологических исследований с учетом молекулярных механизмов развития опухолей. Одним из активно изучаемых направлений в иммунологических исследованиях является дифференциальная диагностика новообразований синоназальной области, а именно, оценка экспрессии CD16 рецепторов на субпопуляциях лимфоидных клеток.

Низкоаффинные рецепторы Fc-фрагментов иммуноглобулинов G III типа (CD16, FCγR3) кодируются у человека двумя генами: FCGR3A и FCGR3B. Экспрессия белка CD16A (FCγR3A) характерна для натуральных киллеров. Дополнительно CD16A обнаруживается на мембране моноцитов, тканеспецифичных макрофагов, γδТ-лимфоцитов и дендритных клеток. Белок CD16B (FCγR3B) является молекулярным маркером нейтрофилов. Наличие CD16A на Т- и γδТ-лимфоцитах позволяет данным клеткам распознавать опухолевые клетки без МНС I, в отличие от Т-киллеров, и осуществлять антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) из-за наличия на их мембране Fc-рецептора. Оценка экспрессии мембранных молекул CD16 используется для определения популяционного состава клеток периферической крови и их функционального состояния при различных, в том числе онкологических заболеваниях [4].

Целью исследования явилась оценка экспрессии CD16 рецептора на субпопуляциях лимфоидных клеток в периферической крови и опухолевой ткани, а также определение корреляции экспрессии CD16 между резидентными и циркулирующими лимфоидными клетками у пациентов с синоназальными опухолями.

Материалы и методы. Материалом для исследования явились периферическая венозная кровь и биопсийный материал, полученные у пациентов с полипозным риносинуситом (n=16) и инвертированной папилломой (n = 14). Группа сравнения включала пациентов со злокачественными новообразованиями полости носа и околоносовых пазух (n = 13). Клинико-демографическая характеристика исследуемых групп представлена в таблице 1. Диагнозы подтверждены морфологическим исследованием биопсийного материала.

Таблица 1

Клинико-демографическая характеристика пациентов исследуемых групп

Исследуемая группа	Количество, n	Пол, М/Ж	Возраст, года
Пациенты с полипозным риносинуситом	16	9/7	54,0 [45,0÷63,5]
Пациенты с инвертированной папилломой	14	9/5	53,5 [40,0÷69,0]
Пациенты со злокачественными опухолями полости носа	13	9/4	55,0 [45,0÷61,0]

Примечание: указаны медианы и процентиля (25%; 75%).

Выделение опухоль-ассоциированных лимфоидных клеток из опухолевой ткани проводили с помощью набора реагентов для первичной диссоциации опухолевых тканей Tumor Dissociation Kit, (Miltenyi Biotec, Германия). Образцы опухолевой ткани измельчали на фрагменты и инкубировали в течение 1 ч: фрагменты ткани помещали в пробирку для диссоциации объемом 25 мл, содержащую смесь ферментов (100 мкл фермента H, 50 мкл фермента R и 12,5 мкл фермента А на 1 г ткани), и диссоциировали на клеточном диссоциаторе GentleMACS™

Dissociator (Германия). Затем супернатант переносили в другую пробирку и пропускали через стерильный фильтр диаметром 10 мкм и промывали 10 мл физиологического раствора с последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин.

Для выделения мононуклеаров из периферической крови осуществляли разделение клеток на градиенте плотности фиколла-верографина. Периферическую кровь разводили в физиологическом растворе в соотношении 2:1, центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об/мин на градиенте плотности ROTISep-1077 (Германия). К полученной суспензии мононуклеарных клеток добавляли отмывающий фосфатно-буферный раствор (10 мл). Клеточную суспензию подвергали 2-кратному отмыванию, для получения прозрачного супернатанта при последнем отмывании. Иммунофенотипирование мононуклеарной фракции периферической крови и опухолевых ассоциированных лимфоидных клеток опухолевой ткани осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора моноклональных антител к соответствующим антигенам и проточного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 12.0. Статистически значимые различия определяли при уровне $p < 0,05$. Для описательной статистики исследуемых групп использовали показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Сравнение групп и определение статистически значимых различий осуществляли непараметрическим U-критерием Манна-Уитни для независимых переменных. Корреляционный анализ выполняли по Спирмену.

Результаты и обсуждение. В ходе данного исследования проведен анализ субпопуляций лимфоидных клеток в периферической крови и опухолевой ткани пациентов с синоназальными опухолями (таблица 2).

Таблица 2

Характеристика субпопуляций лимфоидных клеток, экспрессирующих CD16 рецептор, в исследуемых группах, %, Me (25÷75%)

Субпопуляции лимфоидных клеток	Исследуемая группа						p
	Пациенты с полипозным риносинуситом		Пациенты с инвертированной папилломой		Пациенты со злокачественными опухолями		
	Периферическая кровь	Опухолевая ткань	Периферическая кровь	Опухолевая ткань	Периферическая кровь	Опухолевая ткань	
	1	2	3	4	5	6	
Т-клетки (CD3+16+), %	6,9 (3,8 ÷14,5)	3,0 (1,03÷5,8)	5,9 (0,36÷8,2)	1,6 (0,7÷7,8)	3,5 (1,9÷5,8)	1,7 (0,7÷2,8)	p₁₋₅=0.05 p ₁₋₃ =0,1 p ₂₋₆ =0.35 p ₂₋₄ =0.61
НК-клетки (CD56+16+), %	74,5 (63.6÷82.3)	39,2 (31,3÷58,7)	77,0 (71,1÷82,1)	27,0 (21,2÷49,7)	84,8 (64,8÷88,2)	20,7 (11,2÷48,3)	p ₁₋₅ =0.42 p₂₋₄=0.05 p₂₋₆=0.02
γδT-клетки (CD3+γδTCR CD16+), %	37,0 (13.6÷53.9)	12,1 (9,1÷16,5)	15,2 (8,8÷35,1)	25,3 (9,6÷34,0)	11,5 (4,6÷42,8)	15,4 (2,7÷21,9)	p₁₋₅=0.04 p ₁₋₃ =0.15 p ₂₋₄ =0.23 p ₄₋₆ =0.17

Примечание: p – уровень статистически значимых различий

Исходя из данных табл.2, у пациентов со злокачественными новообразованиями установлено уменьшение количества Т- и $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих CD16, в периферической крови относительно пациентов с полипозным риносинуситом ($p < 0,05$), при отсутствии статистически значимых изменений в опухолевой ткани. Увеличение количества Т- и $\gamma\delta$ Т-клеток в периферической крови может быть связано со слабым проникновением Т-клеток в плотную ткань новообразований. Тем самым предполагая, о недопущении интравазации опухолевых клеток с их дальнейшей малигнизацией в других органах, путем распознавания их Т-клетками с CD16+ и запуском механизма антителозависимой клеточной цитотоксичности, которая снижается под воздействием ингибирующих рецепторов в микроокружении опухоли, приводя к истощению Т-клеток [5]. В биопсийном материале опухолевой ткани установлено статистически значимое снижение количества НК-клеток у пациентов со злокачественными новообразованиями относительно пациентов с полипозным риносинуситом.

Таблица 3

Коэффициенты корреляции (R) между показателями экспрессии CD16+ на субпопуляциях лимфоидных клеток в периферической крови и опухолевой ткани между группами пациентов с синоназальными опухолями

Параметр	Т-клетки (CD3+16+)	НК-клетки (CD56+16+)	γδТ-клетки (CD3+γδTCR+CD16+)
ПРС и ЗНО	0,39*	0,26	0,09
ПРС и ИП	0,43*	0,2	-0,06
ИП и ЗНО	0,49*	0,36	0,1
ПРС, ИП и ЗНО	0,44*	0,26	0,24

Примечание: * $p < 0,05$

Коэффициенты корреляции между показателями экспрессии CD16+ на субпопуляциях лимфоидных клеток в периферической крови и опухолевой ткани между группами пациентов с синоназальными опухолями представлены в таблице 3. Показатель экспрессии CD16+ на Т-клетках в периферической крови у пациентов из групп с ИП и ЗНО коррелировал с показателем в опухолевой ткани, и составил 0,49 при уровне значимости (p) меньше 0,05, отражая умеренную положительную корреляционную связь. Данная сила корреляционной связи между показателями экспрессии CD16+ на Т-клетках в периферической крови и в опухолевой ткани отмечена у пациентов из групп с ПРС и ИП, коэффициент корреляции (R) составил 0,43 при уровне значимости (p) меньше 0,05. У пациентов с ПРС и ЗНО коэффициент корреляции составил $R=0,39$ при уровне значимости (p) меньше 0,05. Корреляционная связь между показателем экспрессии CD16+ на Т-клетках в периферической крови и тем же показателем на Т-клетках в опухолевой ткани является слабой положительной, по сравнению с показателем экспрессии CD16+ на Т-клетках между пациентами с ИП и ЗНО, ПРС и ИП.

Объединив значения показателей экспрессии CD16+ по всем группам, статистически значим ($p < 0,05$) считался один результат. Коэффициент корреляции (R) составил 0,44, что доказывает умеренную положительную корреляционную связь между экспрессией CD16+ на Т-клетках в периферической крови и опухолевой ткани.

Заключение. У пациентов со злокачественными опухолями полости носа выявлено статистически значимое снижение количества мукозальных натуральных киллерных клеток, экспрессирующих рецептор CD16, опосредующий развитие антителозависимой клеточной цитотоксичности по отношению к трансформированным клеткам. Кроме того, установлено снижение экспрессии CD16+ на Т- и γδТ-клетках в периферической крови у пациентов со злокачественными новообразованиями в сравнении с пациентами с полипозным риносинуситом и инвертированной папилломой. Выявлена положительная корреляционная связь показателя экспрессии CD16+ между резидентными и циркулирующими Т-клетками у пациентов с синоназальными опухолями, что свидетельствует о вовлеченности лимфоцитов с экспрессией CD3+16+ в механизмы противоопухолевого иммунитета посредством АЗКЦ. Результаты свидетельствуют о потенциальной возможности использования показателя экспрессии CD16+ на циркулирующих Т-клетках в качестве прогностического биомаркера малигнизации синоназальных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sinonasal tumors: a clinicopathologic update of selected tumors / Pieter J. Slootweg [et al.] // Eur Arch Otorhinolaryngol. – 2013. – № 270. – P. 5-20.
2. Верещагин, М.Ю. Полипозный риносинусит / М.Ю. Верещагин, А.У. Минкин // Экология человека. – 2012. – . – № 8. – С. 54-58.
3. Сапова, К. И. Инвертированная папиллома синоназальной локализации: современные представления об этиологии, патогенезе, классификации и клинических проявлениях / К. И. Сапова [и др.] // Российская оториноларингология. – 2017. – № 4. – С. 82–87.
4. Уровень мРНК CD16A и CD16B как потенциальный иммунологический маркер при колоректальном раке / Н.В. Красногорова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 1, № 18. – С. 220-227.
5. LANIER, LEWIS L. Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen) / LEWIS L. LANIER, THOMAS J. KIPPS, JOSEPH H. PHILLIPS // J Exp Med. – 1985. – . – V. 6, № 162. – P. 2089-2106 .

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования
«Международный государственный экологический
институт имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета



САХАРОВСКИЕ ЧТЕНИЯ 2024 ГОДА: ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ XXI ВЕКА

SAKHAROV READINGS 2024: ENVIRONMENTAL PROBLEMS OF THE XXI CENTURY

Материалы 24-й международной научной конференции

23-24 мая 2024 г.
г. Минск, Республика Беларусь

В двух частях
Часть 1

Минск
«ИВЦ Минфина»
2024