

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭФФЕКТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОПУХОЛЯМИ ПОЛОСТИ НОСА

Е.М. Назаренко^{1,2}, Н.А. Морозова³, Г.И. Иванчик², О.А. Корнелюк⁴, Д.Б. Нижегородова^{1,2}

¹НИИ экспериментальной и клинической медицины БГМУ, г. Минск, Беларусь;

²УО «МГЭИ им. А.Д. Сахарова» БГУ, г. Минск, Беларусь;

³ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», аг. Лесной, Беларусь;

⁴ГУ «РНПЦ оториноларингологии», г. Минск, Беларусь

Естественные киллеры (NK-клетки) и цитотоксические Т-лимфоциты являются основными популяциями клеток иммунной системы, которые осуществляют эффекторные реакции против трансформированных клеток организма за счет дегрануляции с высвобождением протеазы гранзима В и продукции цитокинов, включая интерферон-гамма (IFN- γ), для цитолиза клеток-мишеней. Актуальным направлением иммуноонкологии является выяснение особенностей реализации цитотоксических механизмов у пациентов с новообразованиями для прогнозирования малигнизации опухолевого процесса и поиска новых подходов к терапии.

Цель работы: оценить цитотоксический потенциал эффекторных лимфоцитов пациентов с синоназальными новообразованиями в ко-культуре с опухолевой линией K562.

Материалом исследования явились мононуклеары периферической крови (МПК), полученные из цельной венозной крови 19 пациентов (м/ж: 11/8), из которых 8 пациентов – с диагнозом злокачественных новообразований полости носа (ЗНО) в возрасте 61,0 (53,3÷71,3) лет, 7 пациентов – с инвертированной папилломой (ИП) в возрасте 64,0 (39,0÷67,5) лет и 4 пациента – с полипозным риносинуситом (группа сравнения) в возрасте 45,5 (42,0÷49,3) лет. Контрольную группу составили 10 здоровых лиц (м/ж: 5/5) в возрасте 41,5 (20,0÷57,5) лет. Фенотипирование МПК осуществляли с использованием моноклональных антител к CD56-PE и CD16-ECD (Elabscience, Китай) на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США). Совместное культивирование МПК исследуемых групп с опухолевой клеточной линией K562 проводили в полной среде RPMI-1640 (Gibco, Германия) в соотношении 6,25:1 в течение 3-х суток в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Внутриклеточное содержание гранзима В определяли методом проточной цитометрии по адаптированной методике внутриклеточного окрашивания с помощью антител CD3-FITC и CD56-PE (Elabscience, Китай) и Granzyme B-APC (BioLegend, Китай). Концентрацию гранзима В и IFN- γ в супернатантах определяли методом ИФА с использованием коммерческих наборов «Human Granzyme B ELISA Kit» (Elabscience, Китай) и «Гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ» (Вектор-БЕСТ, Россия). Чувствительность наборов составила 9,38 пг/мл и 2,0 пг/мл, соответственно. Результаты регистрировали на микропланшетном фотометре «Sunrise» (Tecan, Австрия) при $\lambda = 450$ нм. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программы Statistica 8.0 («Stat Soft Inc.», США): использовали значение медианы, 25% и 75% процентилей, определение статистически значимых различий для зависимых переменных осуществляли критерием Вилкоксона, для независимых – критерием Манна-Уитни, для корреляционного анализа использовали метод Спирмена.

Установлено снижение количества гранзим В-позитивных NK-клеток в ко-культурах МПК и K562 у пациентов с ЗНО (80,8 (77,9÷82,6) %) и пациентов с ИП (69,2 (66,1÷70,8) %) в сравнении с контрольной группой (88,0 (84,3÷91,9) %, $p < 0,05$). При этом совместное культивирование с K562 не приводило к активной дегрануляции NK-клеток пациентов с новообразованиями по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Наряду с этим, показано увеличение внутриклеточного содержания гранзима В в Т-лимфоцитах у пациентов с ЗНО (30,8 (28,0÷32,8) %) по сравнению с контрольной группой (15,7 (12,2÷28,8) %, $p < 0,05$) и группой сравнения (17,0 (6,0÷25,9) %, $p < 0,001$). Аналогичное увеличение уровня гранзима В в Т-лимфоцитах установлено у пациентов с ИП (26,4 (20,2÷31,7) %) относительно группы сравнения ($p < 0,05$).

Внеклеточное содержание гранзима В в супернатантах снижалось в ко-культурах МПК с клетками-мишенями у пациентов с ЗНО (56,8 (1,5÷278,1) пг/мл) относительно пациентов с ИП (395,8 (130÷422,4) пг/мл, $p < 0,03$) и контрольной группы (320,3 (45,4÷658,6) пг/мл, $p < 0,04$). Во всех исследуемых группах совместное культивирование с K562 приводило к статистически значимому увеличению концентрации гранзима В по сравнению с культурой МПК ($p < 0,05$).

Для пациентов с ЗНО и ИП выявлено уменьшение внеклеточного содержания IFN- γ (510,5 (82,8÷1633,5) пг/мл и 1549,5 (1227,8÷1622,3) пг/мл, соответственно) относительно контрольной группы (3412,0 (2547,0÷3632,0) пг/мл; $p < 0,02$ и $p < 0,05$, соответственно) в супернатантах совместных культур МПК и K562.

Одним из механизмов распознавания НК-клетками опухолевых мишеней является антитело-зависимая клеточная цитотоксичность, опосредованная взаимодействием с рецептором к Fc-фрагменту иммуноглобулина класса G (CD16), который способен связываться с онкоантигенами. Для циркулирующих НК-клеток пациентов с ЗНО характерна тенденция к снижению экспрессии CD16 (52,2 (37,7÷72,4) %) в сравнении с пациентами с ИП (77,6 (74,4÷81,3) %) и группой сравнения (76,9 (40,2÷82,1) %) ($p<0,05$). При этом установлена сильная корреляционная связь между количеством циркулирующих CD56+CD16+ НК-клеток и внеклеточной продукцией гранзима В в ко-культурах МПК и K562 ($R=0,86$, $p<0,0001$).

В ходе корреляционного анализа степени малигнизации опухолевого процесса и описанных иммунологических показателей установлены следующие взаимосвязи: с увеличением степени малигнизации опухолевого процесса снижалось количество гранзим В-позитивных НК-клеток ($R=-0,48$; $p<0,01$), как и уровни внеклеточного гранзима В ($R=-0,30$; $p=0,05$) и IFN- γ ($R=-0,47$; $p=0,02$), тогда как количество гранзим В-позитивных Т-клеток увеличивались ($R=0,40$; $p=0,03$) при совместном культивировании МПК исследуемых групп с K562.

Таким образом, цитотоксический потенциал эффекторных лимфоцитов пациентов со злокачественными опухолями полости носа характеризуется снижением циркулирующих CD56+CD16+ НК-клеток и гранзим В-позитивных НК-клеток в ко-культуре с K562, что может указывать на возможные нарушения или невосприимчивость механизмов активации и дегрануляции НК-клеток пациентов с синоназальными новообразованиями. Вместе с тем, для пациентов со злокачественными опухолями характерно повышение внутриклеточной продукции гранзима В в Т-лимфоцитах при совместном культивировании с K562, что коррелирует с увеличением степени малигнизации опухолевого процесса и может быть использовано в качестве прогностического маркера прогрессии синоназальной онкопатологии. Процесс малигнизации новообразований полости носа может обуславливаться нарушениями реализации эффекторных механизмов цитотоксических лимфоидных клеток посредством сниженной внеклеточной продукции гранзима В и IFN- γ .

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЦЕНТР РАДИАЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»

**«Современные методы диагностики и лечения
иммунодефицитных состояний»**
(г. Гомель, 29 ноября 2024 г.)

Материалы республиканской
научно-практической конференции
с международным участием

Под общей редакцией
доктора медицинских наук, профессора А.В. Рожко

Гомель
ГУ «РНПЦ РМиЭЧ»
2024