

РОЛЬ Dkk3 В РЕГУЛЯЦИИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ

А. А. Страх¹⁾, А. В. Величко^{1), 2)}, Е. М. Назаренко^{1), 2)}, Д. Б. Нижегородова^{1), 2)},
М. М. Зафранская^{1), 2)}

¹⁾ Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова», Белорусский государственный университет, ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь, kaf_immunal@iseu.by

²⁾ НИИ экспериментальной и клинической медицины, Белорусский государственный медицинский университет, пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Беларусь, bsmu@bsmu.by

Dkk3 представляет собой белок, который у человека кодируется геном Dkk3. Данный белок принимает участие в регуляции сигнального пути Wnt, в отличие от других белков его семейства. Dkk3 имеет разнообразные биологические роли, включая дифференцировку стволовых клеток, гомеостаз тканей, защита хряща от деградации. Dkk3 обладает иммуномодулирующими функциями и играет сложную роль в развитии рака, выступая либо в качестве супрессора опухолей, либо в качестве онкогена. Полученные результаты свидетельствуют о возможном вовлечении Dkk3 в регуляцию цитотоксичности лимфоцитов и потенциальном использовании Dkk3 в качестве биомаркера малигнизации опухолевого процесса.

Ключевые слова: Dkk3; сигнальный путь Wnt; цитотоксические лимфоциты; онкоген; ген-супрессор опухолей.

ROLE OF Dkk3 IN REGULATION OF LYMPHOCYTE CYTOTOXICITY

А. А. Strakh¹⁾, А. В. Vialichka^{1), 2)}, Е. М. Nazaranka^{1), 2)}, Д. В. Nizheharodava^{1), 2)},
М. М. Zafranskaya^{1), 2)}

¹⁾ International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, 23/1 Dolgobrodskaya St., 220070, Minsk, Belarus, kaf_immunal@iseu.by

²⁾ Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, BSMU, 83 Dzerzhinsky Ave., 220083, Minsk, Belarus, bsmu@bsmu.by

Dkk3 (Dickkopf-related block 3) is a protein that in humans is encoded by the Dkk3 gene. This protein participates in the regulation of the Wnt signaling pathway, unlike other proteins in its family. Dkk3 has a variety of biological roles, including stem cell differentiation, tissue homeostasis, and protection of cartilage from degradation. Dkk3 has immunomodulatory functions and plays a complex role in the development of cancer, acting either as a tumor suppressor or as an oncogene. The results obtained indicate the possible involvement of Dkk3 in the regulation of lymphocyte cytotoxicity and the potential use of Dkk3 as a biomarker of the malignancy of the tumor process.

Keywords: Dkk3; Wnt signaling pathway; cytotoxic lymphocytes; oncogene; tumor suppressor gene.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2025-1-232-236>

Введение. Изучение роли Dkk3 (Dickkopf-related block 3, диккопф-связанный белок 3) в организме человека направлены на поиск молекулярных маркеров онкогенеза, необходимых для разработки новых прогностических, диагностических и терапевтических технологий, и расширения понимания фундаментальных процессов опухолевого процесса. Данный белок содержит два богатых цистеином участка и участвует в эмбриональном развитии посредством взаимодействия с сигнальным путем Wnt, что отличает данный белок от других членов Dkk. Молекулы Wnt относятся к семейству гликопротеинов, это целый класс белков, регулирующих

такие типы клеточной активности как гибель клетки, пролиферация, миграция, полярность и экспрессия генов. Участие Dkk3 в сигнальном пути Wnt играет немаловажную роль в изучении и открытии новых функций данного белка [5].

Dkk3 имеет разнообразные биологические роли, которые связаны с деградацией хряща, гипертрофией сердца, артеропротекцией, легочной вентиляцией и окислительным стрессом. Внутриклеточный и внеклеточный Dkk3 имеют ключевое значение в предотвращении гипертрофии сердца и способствуют дифференциации стволовых клеток в гладкомышечные клетки сосудов, активируя при этом ряд внутриклеточных сигнальных путей. Также отмечено влияние Dkk3 на клеточные антиоксидантные защитные механизмы и участие в защите клетки от окислительного повреждения, однако все биологические роли данного белка не объяснены молекулярными механизмами и являются направлением для дальнейшего изучения [4].

Dkk3 выступает в качестве модулятора иммунной системы, что привлекает многих иммунологов для дальнейшего его изучения. Dkk3 экспрессируется на самых высоких уровнях в иммунопривилегированных органах, таких как эмбрион, плацента, глаза и мозг, что совместимо с ролью Dkk3 в их иммунной толерантности. Обнаружено, что Dkk3 имеет ключевое значение для формирования периферической толерантности Т-клеток CD8 в трансгенной системе рецепторов Т-клеток (TCR). Данные наблюдения подтверждают, что уровень экспрессии Dkk3 увеличен в толерантных Т-клетках CD8, что, в свою очередь, способствует снижению общей реактивности этих клеток *in vitro*. При этом, в условиях *in vivo*, блокировка функции Dkk3 приводит к нарушению толерантности, что приводит к уничтожению опухолей, экспрессирующих целевой антиген, а также отторжение аутологичных кожных трансплантатов.

Показано, что Dkk3 выполняет иммуномодулирующие функции и играет сложную роль в развитии рака, выступая в качестве супрессора опухолей, так и в роли онкогена, в зависимости от конкретных условий. Неконтролируемая активация сигнальных путей Wnt у взрослых, вызванная соматическими генетическими мутациями или эпигенетическими изменениями, является основой злокачественной трансформации, прогрессии опухолей и устойчивости раковых клеток к терапии. В клинических испытаниях проводятся тестирования ингибиторов сигнального пути Wnt. Однако существуют и другие перспективные области для исследования, в частности, связано с регуляцией определённым внеклеточно секретируемым фактором, Dkk3 [4].

Рассматривая роль Dkk3 в регуляции цитотоксичности лимфоцитов, можно будет познать новые или ранее изученные, но в другом контексте, возможности Dkk3 и иммунной системы. Полученные результаты в дальнейшем можно будет использовать в регенеративной медицине и иммуномодулирующей терапии.

Целью исследования явилась оценка роли Dkk3 в регуляции цитотоксичности лимфоцитов, посредством выявления корреляции между Dkk3 и цитотоксической активностью лимфоцитов.

Материалы и методы. Материалом для исследования явилась периферическая венозная кровь, полученная у пациентов с инвертированной папилломой (ИП) (n=4), со злокачественными новообразованиями (ЗНО) (n=3) и у здоровых доноров (n=3). Диагнозы подтверждены морфологическим исследованием биопсийного материала.

Для выделения моноклеаров из периферической крови (МПК) 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 моноклеарных клеток добавляли отмывающий фосфатно-буферный раствор (10 мл). Клеточную суспензию подвергали 2-кратному отмыванию, для получения прозрачного супернатанта при последнем отмывании. В качестве опухолевых клеток-мишеней использовали суспензионную перевиваемую клеточную линию K562 в логарифмической фазе роста.

Совместное культивирование МПК и К562 проводили в 96-луночном U-образном планшете в питательной среде RPMI-1640 (Gibco, Германия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Германия), 1% антибиотика-антимикотика (Gibco, Германия), 1% L-глутамина (Gibco, Германия) в соотношении соответственно, эффе́ктор : мишень 6,25 : 1. Количество клеток-мишеней составило 1×10^4 клеток на лунку. Ко-культивирование проводили в CO_2 -инкубаторе в течение 3-х суток в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 при 37 °С.

Для количественного определения Dkk3 *in vitro* в супернатантах клеточных культур поставлен иммуноферментный анализ (ИФА) (Cloud-Clone-Corp., USA). Постановка ИФА осуществлялась по инструкции к данному набору. Учет результатов проводили на спектрофотометре, при длине волны 450 нм. Определяли концентрацию Dkk3 в образцах путем сравнения оптической плотности образцов со стандартной кривой.

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 лимфоцитов пациентов с синоназальными новообразованиями и контроля в культурах МПК с опухолевой клеточной линией К562 (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация Dkk3 в супернатантах клеточных культур исследуемых групп пациентов, %, Ме (25÷75%)

Клеточные культуры	Исследуемая группа			p (M-W)
	Контрольная группа	Пациенты с инвертированной папилломой	Пациенты со злокачественными опухолями	
	1	2	3	
МПК	0,66 (0,59÷1,63)	1,91 (1,05÷2,54)	0,68 (0,66÷3,62)	p2-3=0,33 p1-2=0,05 p1-3=0,38
МПК + К562	0,61 (0,61÷0,87)	1,84 (1,04÷2,33)	0,87 (0,65÷2,20)	p2-3=0,14 p1-2=0,01 p1-3=0,06
Погибшие К562, %	63,54 (59,08÷77,3)	41,76 (37,4÷46,2)	42,6 (22,9÷46,5)	p2-3=0,65 p1-2=0,02 p1-3=0,05

Примечание: p – уровень статистически значимых различий, МПК – мононуклеарные клетки периферической крови, К562 – линия клеток хронической миелоидной лейкемии.

Исходя из данных табл. 1, у пациентов с инвертированной папилломой установлено увеличение концентрации (нг/мл) Dkk3 по сравнению с контрольной группой в ко-культуре с К562 ($p=0,05$), при отсутствии статистически значимых отличий в культуре МПК. Увеличение концентрации Dkk3 в ко-культуре с К562 может быть связано с худшим прогнозом и снижением противоопухолевого иммунитета [1], также высокая экспрессия Dkk3 может стимулировать пролиферацию и миграцию клеток *in vitro*, поддерживая рост опухоли и выступая в качестве онкогена [2]. В результате анализа также установлены статистически значимые отличия между пациентами с инвертированной папилломой и контрольной группой в ко-культуре с К562

($p=0,01$), а именно, увеличение концентрации Dkk3 у пациентов с инвертированной папилломой. При сравнении по показателю погибших клеток культуры K562 (цитотоксичность) между исследуемыми группами выявлены статистически значимые различия между контрольной группой и пациентами с ИП, и пациентами с ЗНО. Отмечалось увеличение процента погибших K562 в контрольной группе, что, возможно, свидетельствует о подавлении активности цитотоксических клеток Dkk3 у здоровых лиц.

Для выявления взаимосвязи по показателю концентрации Dkk3 при различных условиях культивирования с диагнозом пациентов с инвертированной папилломой, злокачественными новообразованиями и контрольной группой рассчитаны коэффициенты корреляции (R). При этом, контрольная группа отмечалась 1, диагноз «Инвертированная папиллома» - 2 и «Злокачественные образования полости носа и околоносовых пазух» - 3 (табл. 2).

Таблица 2

Коэффициенты корреляции (R) концентрации Dkk3 между различными условиями культивирования и диагнозом пациентов

	МПК + K562	Уровень значимости (p)	Погибшие K562 (цитотоксичность)	Уровень значимости (p)
Диагноз	0,36	0,1	-0,72	0,0004

По данным таблицы 2, коэффициент корреляции (R) по концентрации Dkk3 с диагнозом при ко-культивировании с K562 составил 0,36 при уровне статистической значимости (p) 0,1, что свидетельствует о слабой корреляционной связи с тенденцией к статистической значимости. Для расчета корреляции по показателю концентрации Dkk3 с цитотоксичностью использовали, процентное содержание погибших клеток культуры K562 при ко-культивировании с МПК. Коэффициент корреляции (R) концентрации Dkk3 с цитотоксичностью составил -0,72 при уровне статистической значимости (p) 0,0004, что указывает на наличие отрицательной сильной корреляционной связи, при снижении показателя цитотоксичности, заболевание (малигнизация опухоли) может прогрессировать в более тяжелую форму. Также рассчитан коэффициент корреляции по показателю концентрации Dkk3 между МПК + K562 и цитотоксичностью, коэффициент корреляции составил -0,15, при уровне статистической значимости (p) 0,67.

В исследовании Mourtada J и др. [3] экспрессия Dkk3 коррелирует с инфильтрацией лимфоцитов CD8+ и макрофагов при ВПЧ-положительном плоскоклеточном раке головы и шеи, что подтверждает полученные нами результаты о корреляции концентрации Dkk3 между МПК в ко-культуре с K562 и показателем погибших K562, что свидетельствует о возможной роли Dkk3 в регуляции цитотоксичности лимфоцитов.

Также рассмотрена корреляция по показателю концентрации Dkk3 между МПК в ко-культуре с K562 и цитотоксичностью внутри групп исследуемых пациентов (табл. 3).

Таблица 3

Коэффициенты корреляции (R) между концентрацией Dkk3 в МПК в ко-культуре с K562 и цитотоксичностью внутри исследуемых групп

	Контрольная группа	ИП	ЗНО
МПК + K562	Погибшие K562 (цитотоксичность)		
	-0,50 p=0,31	-0,95 p=0,05	1 0,3

В таблице 3 представлены коэффициенты корреляции (R) по показателю концентрации Dkk3 между МПК+K562 и цитотоксичностью внутри групп. У пациентов из группы с инвертированной папилломой коэффициент корреляции (R) составил -0,95 при уровне значимости (p) 0,05, что говорит о наличии отрицательной сильной корреляционной связи между концентрацией Dkk3 в МПК + K562 и показателем цитотоксичности. Наличие данной связи указывает на то, что увеличение количества погибших клеток K562 связано со снижением концентрации Dkk3 в МПК+K562 и наоборот. Высокая экспрессия Dkk3 может подавлять активацию цитотоксических клеток, что приводит к снижению цитотоксичности. Это может указывать на возможную роль Dkk3 как негативного регулятора иммунного ответа, что может способствовать опухолевой прогрессии, позволяя опухолевым клеткам избегать иммунного ответа.

Заключение. У пациентов с инвертированной папилломой установлено увеличение концентрации Dkk3 по сравнению с контрольной группой в МПК и МПК в ко-культуре с K562 (p=0,05 и p=0,01 соответственно), также по показателю цитотоксичности (количество погибшей клеточной линии K562) наблюдалось увеличение концентрации в контрольной группе по сравнению с пациентами с инвертированной папилломой (p=0,02) и пациентами со злокачественными новообразованиями (p=0,05), что свидетельствует о вовлеченности Dkk3 в механизмы противоопухолевого иммунитета, выполняя онкогенную функцию. Выявлена отрицательная сильная корреляционная связь между цитотоксичностью лимфоцитов пациентов с диагнозом при p=0,0004. Также установлена отрицательная корреляционная связь между концентрацией Dkk3 в МПК в ко-культуре с K562 и цитотоксичностью внутри исследуемых групп при p=0,05, что вероятно отражается на роли Dkk3 в регуляции цитотоксичности лимфоцитов, и может быть следствием взаимодействия опухолевых клеток с иммунными или стромальными клетками.

Библиографические ссылки

1. High DKK3 expression related to immunosuppression was associated with poor prognosis in glioblastoma: machine learning approach. / Myung-Hoon Han [et al.] // *Cancer immunology, immunotherapy*. 2022. Vol. 71, iss. 12. P. 3013-3027.
2. DKK3 Overexpression Increases the Malignant Properties of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells / Naoki Katase [et al.] // *Oncology research*. 2018. Vol. 26, iss. 1. P. 45-58.
3. A novel ΔNp63-dependent immune mechanism improves prognosis of HPV-related head and neck cancer / Jana Mourtada, [et al.] // *Frontiers in immunology*. 2023. Vol. 14. P. 1-18.
4. The Multifaceted Role of Human Dickkopf-3 (DKK-3) in Development, Immune Modulation and Cancer / J. Mourtada [et al.] // *Cells*. 2023. Vol. 13, iss 1. P. 1-14.
5. Hayat R. A., Manzoor M., Hussain A. Wnt signaling pathway: A comprehensive review // *Cell Biol Int*. 2022. Vol. 46, iss. 6. P. 863-877.

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
МЕЖДУНАРОДНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А. Д. САХАРОВА
БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА



САХАРОВСКИЕ ЧТЕНИЯ – 2025: ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ XXI ВЕКА

SAKHAROV READINGS – 2025: ENVIRONMENTAL PROBLEMS OF THE XXI CENTURY

**Материалы
25-й Международной научной конференции**

**Республика Беларусь, Минск
22–23 мая 2025 г.**

В двух частях

Часть 1

Минск
БГУ
2025