

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ γ IFN И IL-17 СПЛЕНОЦИТАМИ У МЫШЕЙ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА

А. В. Величко^{1), 2)}, Д. В. Луцкович³⁾, Д. Б. Нижегородова^{1), 2)}

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

²⁾ Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета, Боровлянский с/с, 106-2, 223053, Минский р-н, Минская обл., Беларусь, nil@bsmu.by

³⁾ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, ул. Фрунзенская 43, 223053, Боровляны, Минская область, Беларусь, lutskovichdm@gmail.com

В данной работе проведен анализ внутриклеточной продукции γ -интерферона и интерлейкина-17 в спленоцитах у мышей с экспериментальной нейробластомой. Установлено снижение синтеза γ -интерферона наряду с увеличением продукции интерлейкина-17 как в дендритных клетках, так и Т-лимфоцитах у мышей с моделью опухолевого процесса.

Ключевые слова: микроокружение опухоли; спленоциты; γ -интерферон; интерлейкин-17, проточная цитометрия.

THE INTRACELLULAR PRODUCTION OF γ IFN AND IL-17 BY SPLENOCYTES IN MICE WITH EXPERIMENTAL TUMOR MODEL

A. Vialichka^{1), 2)}, D. Lutskovich³⁾, D. Nizheharodava^{1), 2)}

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

²⁾ Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University, Borovlyany, 106-2, 223053, Minsk region, Belarus, nil@bsmu.by

³⁾ Republican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology and Immunology, Frunzenskaya str., 43, 223053, Borovlyany, Minsk region, Belarus, lutskovichdm@gmail.com

In this work, the intracellular production of gamma-interferon and interleukin-17 in splenocytes of mice with experimental neuroblastoma was analyzed. A decrease in the synthesis of γ -interferon was found along with an increase in the production of interleukin-17 in both dendritic cells and T-lymphocytes in mice with a model of the tumor process.

Keywords: tumor microenvironment; splenocytes; gamma interferon; interleukin-17, flow cytometry.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2025-1-167-170>

Введение. Опухолевое микроокружение (ТМЕ) представлено клетками врожденной и адаптивной иммунной системы, которые способствуют развитию опухолей и иммунному уклонению. ТМЕ включает взаимодействия между опухолевыми и иммунными клетками, внеклеточных компонентов, таких как цитокины, хемокины и другие факторы, высвобождаемые или создаваемые внеклеточным матриксом. ТМЕ формируется под воздействием генетических мутаций, а также экологических факторов окружающей среды, включая онкогенные вирусы и нарушение микробиоты [1].

Иммунные клетки и цитокины обеспечивают противоопухолевый ответы, но также могут способствовать иммуносупрессии опухоли и прогрессированию заболевания. В последнее

время гамма-интерферон (γ IFN) и интерлейкин 17 (IL-17) привлекают все большее внимание как ключевые факторы, которые модулируют ТМЕ [2].

IFN γ способствует активации, клональной экспансии и секреции γ IFN цитотоксических CD8⁺ Т-клеток, которые напрямую индуцируют апоптоз раковых клеток или усиливает экспрессию главного комплекса гистосовместимости на опухолевых клетках, увеличивая их иммуногенность, что, в свою очередь, может вызвать гибель опухолевых клеток. Благодаря высокоаффинным рецепторам клеточной поверхности γ IFN модулирует сигнальные пути, что приводит к регуляции более 2000 генов с различными паттернами временной экспрессии. Индукция генных продуктов как нефосфорилированным, так и фосфорилированным STAT1 после связывания лиганда приводит к изменениям в выживании опухолевых клеток, ингибированию ангиогенеза и усилению действия Т-клеток, естественных клеток-киллеров и дендритных клеток (DCs) [1, 2].

IL-17 синтезируется хелперными Т-клетками и играет противоречивую роль в контексте иммунитета к раку, стимулирует ангиогенез и способствует возникновению опухолей. IL-17 связывается и передает сигналы через рецептор IL-17A, что приводит к высвобождению воспалительных медиаторов, таких как IL-1, IL-6, IL-8, IL-23, TNF- α и нескольких хемокинов, для дальнейшей стимуляции воспалительного каскада. Поскольку воспаление считается стимулятором канцерогенеза, оценка IL-17 при развитии рака является необходимостью [3].

Таким образом, γ IFN и IL-17 в ТМЕ может изменять возникновение, прогрессирование и регрессию опухолевого процесса, способствовать контролю прогрессирования злокачественных новообразований и достижению положительных результатов в диагностике и терапии.

Цель исследования – оценить внутриклеточную продукцию γ IFN и IL-17 спленоцитами у мышей с экспериментальной моделью опухолевого процесса.

Материалы и методы. Материалом исследования явились спленоциты лабораторных мышей линии A/J с экспериментальной моделью нейробластомы (n=5) и здоровых мышей (n=5). Спленоциты выделяли из селезенки путем механической дезагрегации с последующей сепарацией на градиенте плотности с $\rho=1,087$ г/см³ (Carl Roth, Германия). Культивирование спленоцитов 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, США) в CO₂-инкубаторе в течение 3-х суток при 5% CO₂ и 37 °C.

Для определения внутриклеточного γ IFN и IL-17 за 4 часа до конца инкубации добавляли 4 нг/мл форбол-12-мирилата-13-ацетата (Sigma, Германия), 1 мкг/мл кальциевой соли иономицина и 10 мкг/мл брэфельдина А (Cayman Chemicals, США). После инкубации окрашивали моноклональными антителами к поверхностным CD3-FITC для определения Т-лимфоцитов и CD3-FITC, МНСII-PC5, CD11c-PC7 для определения DCs (Elabscience, Китай) согласно инструкции производителя в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре, фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma, Германия), пермеабилizировали 2% Triton X («Sigma», Германия), а затем проводили внутриклеточное окрашивание с использованием моноклональных антител γ IFN-PE и IL-17-PC7 (Elabscience, Китай) согласно инструкции производителя, оценивали методом проточной цитометрии с помощью проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы STATISTICA 8.0.

Результаты. Среди популяций иммунных клеток идентифицировали DCs с фенотипом CD11c⁺МНСII⁺CD3⁻ и CD3⁺Т-лимфоциты. Количество CD3⁺Т-лимфоцитов в селезенке у мышей с экспериментальной моделью опухолевого процесса и контрольной группе не отличается и составило 74,14 (73,51÷88,49) и 68,06 (60,62÷68,06) %, соответственно. Установлено снижение содержания DCs в селезенке у опытных мышей до 0,23 (0,12÷0,24) % относительно группы сравнения (0,84 (0,49÷1,46) %), $p<0,05$.

DCs передают костимулирующие или ко-ингибиторные сигналы CD3⁺T-клеткам для пролиферации цитотоксических лимфоцитов, продукции цитокинов и усиления эффекторной функции T-клеток. Активация антиген-специфических T-клеток будет успешной только при получении костимулирующего сигнала от DCs, тем самым способствуя гибели опухолевых клеток. DCs и T-клетки представляют собой основные источники γ IFN и IL-17, которые играют важную роль в формировании ТМЕ, однако их эффекты до конца не изучены [2].

Проведена оценка уровня продукции γ IFN в DCs и CD3⁺T-лимфоцитах и установлено снижение данного цитокина у мышей со злокачественным новообразованием относительно группы сравнения, $p < 0,05$ (табл. 1).

Таблица 1

Экспрессия γ IFN CD3⁺T-лимфоцитами и DCs (Ме (Q0,25–Q0,75) ‰)

	Исследуемые клетки	Мыши с нейробластомой	Группа сравнения	p
Мононуклеары селезенки	DCs	12,10 (10,33÷17,95)	14,32 (8,37÷22,63)	0,05
	CD3 ⁺ T-лимфоциты	2,36 (2,27÷4,58)	6,17 (5,24÷8,04)	0,03

С точки зрения противоопухолевого иммунитета, γ IFN может ингибировать ангиогенез в опухолевой ткани, вызывать апоптоз регуляторных T-клеток и/или стимулировать активность провоспалительных макрофагов M1, NK-клеток и цитотоксических T-лимфоцитов, увеличивать презентацию MHC I и II, тем самым усиливая противоопухолевый иммунитет. Однако γ IFN не всегда оказывает противоопухолевое действие, и некоторые исследования предполагают, что он может способствовать росту опухоли. γ IFN может активировать иммунную активность опухолевых клеток и вызывать секрецию CXCL11 в опухолевых клетках, моноцитах, эндотелиальных клетках и фибробластах. CXCL11 связывается с CXCR7 и способствует ангиогенезу и росту опухоли [1].

Определена внутриклеточная продукция IL-17 CD3⁺T-лимфоцитами и установлено увеличение IL-17 у мышей с экспериментальной моделью опухолевого процесса (табл. 2).

Таблица 2

Экспрессия IL-17 CD3⁺T-лимфоцитами (Ме (Q0,25–Q0,75) ‰)

	Мыши с нейробластомой	Группа сравнения	p
Мононуклеары селезенки	3,76 (0,97÷4,19)	1,07 (0,75÷1,92)	0,05

IL-17 является плеiotропным цитокином, как и другие воспалительные цитокины, с возможными проопухолевыми или противоопухолевыми эффектами, которые часто зависят от иммуногенности и степени воспаления в самой опухоли. С одной стороны, IL-17 способствует прогрессированию опухоли и метастазированию за счет усиления воспалительного ангиогенеза, опухолеобразующего потенциала раковых стволовых клеток, усиливает скорость миграции клеток путем активации факторов транскрипции ядерного фактора- κ B и повышения уровня матриксной металлопротеиназы 2 и 9. IL-17 высоко экспрессируется в периферической крови, злокачественной асцитической жидкости, а также в тканях опухолей печени, желудка, толстой кишки, поджелудочной железы, молочной железы, легких и яичников и положительно коррелирует с агрессивностью злокачественных новообразований. С другой стороны, IL-17 оказывает противоопухолевое действие, модулируя адаптивные иммунные ответы посредством привлечения T-лимфоцитов, усиления активности NK-клеток и стимулирования генерации и активации цитотоксических T-лимфоцитов [3].

Заключение. Таким образом, установлены изменения в субпопуляционном составе иммунных клеток селезенки у мышей с экспериментальной моделью опухолевого процесса, заключающиеся в снижении количества DCs и CD3⁺T-лимфоцитов среди спленоцитов, а также ослабление продукции γ IFN данными популяциями иммунных клеток селезенки в сочетании с увеличением синтеза IL-17 T-клетками у мышей с экспериментальной моделью злокачественного опухолевого процесса.

Библиографические ссылки

1. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review / D. Jorgovanovic [et al.] // Biomarker Research J. 2020. Vol. 8, iss. 49. P. 1–16.
2. The protective and pathogenic role of Th17 cell plasticity and function in the tumor microenvironment / Y. Pan [et al.] // Frontiers in Immunology J. 2023. Vol. 14. P. 1–11.
3. Cytokine and Chemokine Signals of T-Cell Exclusion in Tumors / Y. Zhang [et al.] // Frontiers in Immunology J. 2020. Vol. 11. P. 1–20.

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