

УДК 576.54:616.216-006

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С СИНОНАЗАЛЬНЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

Е. М. НАЗАРЕНКО^{1), 2)}, Н. А. МОРОЗОВА³⁾, А. В. ВЕЛИЧКО^{1), 2)}, Ж. В. КОЛЯДИЧ³⁾, Д. Б. НИЖЕГОРОВА^{1), 2)}

¹⁾Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова,
Белорусский государственный университет,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

²⁾НИИ экспериментальной и клинической медицины, Белорусский государственный медицинский университет,
аэрогородок Лесной, 223040, Минский район, Беларусь

³⁾Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова,
аэрогородок Лесной, 223040, Минский район, Беларусь

Образец цитирования:

Назаренко ЕМ, Морозова НА, Величко АВ, Колядич ЖВ, Нижегородова ДБ. Характеристика эффекторных механизмов цитотоксичности лимфоидных клеток у пациентов с синоназальными новообразованиями. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2024;3:69–79.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2024-3-69-79>

For citation:

Nazaranka EM, Marozava NA, Vialichka AV, Kolyadich JV, Nizheharodava DB. Characteristics of lymphoid cell effector cytotoxicity mechanisms in patients with sinonasal neoplasms. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2024;3:69–79. Russian.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2024-3-69-79>

Авторы:

Елизавета Максимовна Назаренко – магистрант кафедры иммунологии¹; младший научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории².

Наталья Алексеевна Морозова – врач онколог-хирург отделения опухолей головы и шеи.

Алеся Валерьевна Величко – аспирант кафедры иммунологии¹; младший научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории².

Жанна Викторовна Колядич – доктор медицинских наук, профессор; заведующий лабораторией онкопатологии центральной нервной системы с группой онкопатологии головы и шеи.

Дарья Борисовна Нижегородова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры иммунологии¹; ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории².

Authors:

Elizaveta M. Nazaranka, master's student at the department of immunology^a; junior researcher at the department of immunology and biomedicine technology, scientific research of laboratory^b.
el.m.nazarenko@gmail.com

Natallia A. Morozova, oncologist-surgeon, at the department of head and neck tumors.

Alesia V. Vialichka, postgraduate student at the department of immunology^a; junior researcher at the department of immunology and biomedicine technology, scientific research of laboratory^b.
alesjswirskay@mail.ru

Zhanna V. Kolyadich, doctor of science (medicine), full professor; head of the laboratory of oncopathology of the central nervous system with a group of oncopathology of the head and neck.

Darya B. Nizheharodava, PhD (biology), docent; associate professor at the department of immunology^a; leading researcher at the department of immunology and biomedicine technology, scientific research of laboratory^b.

nzh@tut.by

Иммунный ответ на опухоли осуществляется преимущественно посредством эффекторных реакций цитотоксичности, позволяющим напрямую удалять трансформированные клетки организма. Среди защитных противоопухолевых механизмов преобладающим является грануло-опосредованная цитотоксичность, включающая высвобождение литических белков в иммунологический синапс между эффекторной клеткой и мишенью. Изучение особенностей реализации данного механизма цитотоксичности перспективно для поиска молекулярных биомаркеров динамики опухолевой малигнизации и разработки новых направлений таргетной иммунотерапии. В данной работе представлены результаты анализа экспрессии маркера дегрануляции LAMP-1/CD107a и внутриклеточной продукции гранзима В цитотоксическими лимфоидными клетками в ко-культурах с опухолевой клеточной линией K562 у пациентов с доброкачественными и злокачественными синоназальными новообразованиями, находившихся на лечении в отделении опухолей головы и шеи ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» в 2023–2024 гг. Группу сравнения составили пациенты с полипозным риносинуситом, контрольная группа представлена здоровыми лицами. Экспрессия маркеров определялась методом проточной цитофлуориметрии. В результате исследования выявлено увеличение количества НК-клеток и снижение количества Т-клеток в клеточных культурах у пациентов с доброкачественными и злокачественными синоназальными новообразованиями по сравнению с контрольной группой. Установлено увеличение экспрессии CD107a и внутриклеточной продукции гранзима В Т-клетками пациентов со злокачественными синоназальными новообразованиями в ко-культурах с K562 относительно контрольной группы, коррелирующее со степенью злокачественности заболевания ($R = 0,48, p = 0,009$ – для Т-клеток, экспрессирующих CD107, и $R = 0,40, p = 0,03$ – для клеток, продуцирующих гранзим В). При этом экспрессия CD107a и продукция гранзима В НК-клетками в ко-культурах с K562 статистически значимо снижалась у пациентов как с доброкачественными, так и со злокачественными новообразованиями. Полученные данные свидетельствуют о том, что у пациентов со злокачественными синоназальными новообразованиями эффекторные Т-клетки вовлекаются в противоопухолевый ответ, преимущественно используя механизм грануло-опосредованной цитотоксичности, позволяя рассматривать субпопуляции CD107a- и гранзим В-позитивных Т-клеток в качестве потенциальных прогностических маркеров малигнизации опухолевого процесса.

Ключевые слова: контактная цитотоксичность; лимфоидные клетки; лизосомально-ассоциированный мембранный белок-1; гранзим В; синоназальные новообразования; клеточная линия K562.

CHARACTERISTICS OF LYMPHOID CELL EFFECTOR CYTOTOXICITY MECHANISMS IN PATIENTS WITH SINONASAL NEOPLASMS

E. M. NAZARANKA^{a,b}, N. A. MAROZAVA^c, A. V. VIALICHKA^{a,b}, J. V. KOLYADICH^c, D. B. NIZHEHARODAVA^{a,b}

^aInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23/1 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

^bResearch Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University,
agro-town Lesnoy, 223040, Minsk district, Belarus

^cN. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus,
agro-town Lesnoy, 223040, Minsk district, Belarus

Corresponding author: E. M. Nazaranka (el.m.nazarenko@gmail.com)

The immune response to tumors is primarily mediated through effector cytotoxic reactions, which enable the direct removal of transformed cells in the body. Granule-mediated cytotoxicity is one of the main protective antitumor mechanism, which includes the release of lytic proteins into the immunological synapse between the effector cell and the target. Studying the features of this cytotoxic mechanism is promising for identifying molecular biomarkers that can help track the progression of tumor malignancy and develop new approaches to targeted immunotherapy. This article presents the results of LAMP-1/CD107a expression and intracellular granzyme B production by cytotoxic lymphoid cells in co-cultures with tumor cell line K562 from patients with benign and malignant sinonasal tumors, who were treated in the department of head and neck tumors of the Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N. N. Alexandrov in 2023–2024. The comparison group consisted of patients with polypous rhinosinusitis, the control group was represented by healthy individuals. The expression of the markers was determined by flow cytofluorometry. The study revealed an increase in the number of NK cells and a decrease in the number of T cells in cultures in patients with benign and malignant sinonasal neoplasms compared with the control group. An increase in the CD107a expression and intracellular granzyme B production by T cells from patients with malignant sinonasal neoplasms in co-cultures with K562 as compared with the control group was established, that correlates with the degree of disease malignancy ($R = 0.48, p = 0.009$ for T-cells expressing CD107, and $R = 0.40, p = 0.03$ for cells producing granzyme B). At the same time, the CD107a expression and the granzyme B production by NK-cells in co-cultures with K562 was significantly reduced in patients with both benign and malignant neoplasms. The obtained data indicates that effector T cells in patients with malignant sinonasal neoplasms are involved in the antitumor response,

predominantly using the mechanism of granule-mediated cytotoxicity, allowing to consider subpopulations of CD107a- and granzyme B-positive T cells as potential prognostic markers of malignancy of the tumor process.

Keywords: contact cytotoxicity; lymphoid cells; lysosomal-associated membrane protein-1; granzyme B; sinonasal neoplasms; K562 cell line.

Введение

Термин «противоопухолевый иммунитет» относится к врожденным и адаптивным иммунным реакциям, позволяющим выявлять и уничтожать клетки организма, которые подверглись трансформации. При этом основной эффект защитной реакции, а именно гибель опухолевых клеток, реализуют преимущественно цитотоксические лимфоидные клетки, к которым относят собственно цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры (НК-клетки). Цитотоксические лимфоидные клетки могут вызывать гибель инфицированных или трансформированных клеток организма посредством направленного высвобождения литических гранул, содержащих перфорин и гранзимы, либо с помощью Fas-зависимой или TNF-медиированной индукции апоптоза. В то время как первый процесс протекает достаточно быстро, цитотоксичность, опосредованная рецепторами смерти, требует больше времени [1]. В цитотоксических Т-лимфоцитах гранулы синтезируются только после контакта со специфическим антигеном и клеточной активации, тогда как в НК-клетках цитотоксические гранулы образуются во время развития и таким образом обеспечивают быструю реакцию НК-клеток на угрозу онкогенности или инфекции [2].

Цитотоксичность, опосредованная гранулами, может привести к гибели клеток по двум механизмам. Во-первых, некротическая гибель клеток, вызванная быстрым осмотическим потоком через поры перфорина и разрывом мембраны. Второй – апоптоз-индуцированная гибель клеток, вызванная перфорин-опосредованным поглощением гранзима В в клетку-мишень [3; 4]. Гранзим В является наиболее эффективным членом семейства гранзимов и может индуцировать апоптоз в течение нескольких минут после доставки либо за счет прямого расщепления каспаз, либо за счет активации митохондриального пути апоптоза [5; 6]. После дегрануляции литические белки во внеклеточном пространстве становятся полностью функционально активными и могут взаимодействовать с плазматической мембраной как связанных мишеней, так и самих эффекторных клеток. Одним из механизмов защиты цитотоксических клеток от аутолиза является экстернализация ассоциированного с лизосомами белка LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein-1) / CD107a, который способен ингибировать связывание перфорина с собственной мембранной эффекторных клеток, тем самым предотвращая повреждения [7].

В настоящее время знания об особенностях противоопухолевого иммунитета лежат в основе разработки различных иммунотерапевтических стратегий. Основная причина интереса к иммунотерапевтическому подходу заключается в том, что большинство современных методов лечения рака основаны на препаратах, которые либо уничтожают делящиеся клетки, либо блокируют их деление, оказывая негативное воздействие на нормальные пролиферирующие клетки организма, в то время как иммунотерапия представляет собой опухоль-специфичный метод лечения. Таким образом, углубление знаний в области эффекторных механизмов цитотоксичности важны не только для улучшения существующих противораковых методов лечения на основе цитотоксических клеток, но и для поиска дополнительных терапевтических возможностей. Актуальным вопросом в иммуноонкологии остается также выявление потенциальных прогностических молекулярных маркеров прогрессирования и малигнизации новообразований, эффективности иммунотерапии, которые позволили бы персонифицировать лечение пациентов.

Среди всех новообразований большой интерес представляют синоназальные опухоли, которые входят в группу онкологических заболеваний с высокой распространенностью в мире, а Республика Беларусь находится в категории стран с повышенным риском развития таких патологий. Доброкачественные и злокачественные синоназальные новообразования представляют собой гетерогенную группу опухолей, локализация которых включает слизистые оболочки полости носа, рта, носоглотки и гортани. 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 [8]. Синоназальные новообразования имеют мультифакториальную этиологию, включая курение, злоупотребление алкоголем, загрязнение окружающей среды, инфицирование вирусом папилломы человека, недостаточность питания, иммунодефицит и наследственные заболевания [9].

Среди доброкачественных синоназальных новообразований большая часть приходится на инвертированную папиллому (ИП), которая обычно диагностируется на поздней стадии. ИП чаще встречается у взрослых, средний возраст постановки диагноза составляет 55 лет [10]. Предполагают, что вирус папилломы человека играет важную роль в патофизиологии ИП, при этом серотипы 6 и 11 чаще обнаруживаются при доброкачественном течении заболевания, а серотипы 16 и 18 связаны с сопутствующей дисплазией

высокой степени или карциномой, однако данные литературы остаются противоречивыми [11]. Механизм злокачественной трансформации ИП, которая находится в пределах 5–27 %, до сих пор четко не сформулирован. Считается, что воспаление, дисбаланс клеточной пролиферации и апоптоза, а также роль молекул межклеточной адгезии играют определенную роль в злокачественной трансформации. На сегодняшний день отсутствуют определенные гистологические параметры, которые могли бы предсказать злокачественную трансформацию при данном заболевании [12].

Злокачественные опухоли полости носа и придаточных пазух в 70 % случаев имеют эпителиальную природу, из них 80 % составляет плоскоклеточный рак головы и шеи [13]. На возникновение и прогрессирование синоназальной карциномы влияет нарушение регуляции микроокружения опухоли. В частности, подавленная иммунная система, изменения стромы, гипоксия и несбалансированный микробиом полости рта – все перечисленное способствует развитию и метастазированию злокачественных синоназальных новообразований [9; 13].

В связи с этим, целью данного исследования явилась характеристика эффекторных механизмов цитотоксичности лимфоидных клеток в ко-культурах с опухолевой линией K562 у пациентов со злокачественными и доброкачественными синоназальными новообразованиями.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования явились мононуклеары периферической крови (МПК), полученные из цельной венозной крови 19 пациентов (11 мужчин и 8 женщин), среди которых 8 пациентов со злокачественными новообразованиями (ЗНО) в возрасте 61,0 (53,3 ÷ 71,3) лет (3 мужчин и 5 женщин), 7 пациентов с ИП в возрасте 64,0 (39,0 ÷ 67,5) лет (5 мужчин и 2 женщины), находившихся на стационарном лечении в отделении опухолей головы и шеи ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова», а также 4 пациента с полипозным риносинуситом в возрасте 45,5 (42,0 ÷ 49,3) лет (3 мужчины и 1 женщина), которые вошли в группу сравнения. Контрольную группу составили 10 здоровых лиц в возрасте 41,5 (20,0 ÷ 57,5) лет (5 мужчин и 5 женщин). Диагнозы подтверждались гистологическим исследованием биопсийного материала.

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

Совместное культивирование МПК и K562 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 соотношении соответственно, эффектор:мишень 6,25:1. Количество клеток-мишеней составило 1×10^4 клеток на лунку. В качестве контролей использовали культуры K562 (1×10^4 клеток на лунку) или МПК (5×10^5 клеток на лунку). Ко-культивирование проводили в CO₂-инкубаторе в течение 3-х суток в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °C.

Для оценки степени дегрануляции цитотоксических клеток за 4 ч до конца инкубации в пробы добавляли монензин (Tocris Bioscience, Великобритания) в конечной концентрации 5 мкг/мл для ингибирования трансмембранного транспорта, после чего через 1 ч пробы окрашивали моноклональными антителами CD107a-PE (Beckman Coulter, Франция) согласно инструкции производителя. По окончании инкубации пробы переносили в пробирки для цитометра и окрашивали моноклональными антителами CD3-FITC и CD56-PC7 (Elabscience, Китай) в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре согласно инструкции производителя. Учет результатов выполняли на 10 000 Т-лимфоцитов с использованием проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США). NK- и Т-клетки гейтировали по положительной экспрессии маркеров CD56 и CD3 соответственно, среди гейта всех лимфоцитов.

Для количественного определения внутриклеточного гранзима В за 4 часа до конца инкубации добавляли 4 нг/мл форбол-12-миристата-13-ацетата (Sigma, Германия), 1 мкг/мл кальциевой соли иономицина и 10 мкг/мл брэфельдина А (Cayman Chemicals, США). После инкубации МПК окрашивали моноклональными антителами к поверхностным CD3-FITC и CD56-PE (Elabscience, Китай) согласно инструкции производителя в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре, фиксировали 4 % параформальдегидом (Sigma, Германия), пермеабилизировали 2 % Triton X («Sigma», Германия), а затем проводили внутриклеточное окрашивание с использованием моноклональных антител Granzyme B-APC (BioLegend, США) согласно инструкции производителя. Учет результатов выполняли на 10 000 Т-лимфоцитов.

Статистическую обработку данных проводили в программе *STATISTICA 8.0*. Для описательной статистики использовали значение медианы и значения 25 и 75 % процентилей. Определение статистически значимых различий для зависимых переменных осуществляли непараметрическим критерием Вилкоксона (р (W)), для независимых – критерием Манна – Уитни (р (M-W)). Для выявления корреляционной связи

количественных признаков использовали ранговый коэффициент корреляции непараметрических данных Спирмена (R). Во всех случаях результаты принимали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Характеристика субпопуляций лимфоидных клеток в культурах исследуемых групп. В ходе исследования проведен анализ популяций NK- и Т-клеток пациентов с синоназальными новообразованиями, групп сравнения и контроля в культурах МПК и ко-культурах МПК с опухолевой клеточной линией K562 (табл. 1).

Таблица 1

Количество цитотоксических клеток в культурах исследуемых групп пациентов

Table 1

The number of cytotoxic cells in cultures of the study groups

Показатель	Тип культуры	Исследуемая группа				p (M-W)
		Пациенты с ЗНО	Пациенты с ИП	Группа сравнения	Контрольная группа	
		1	2	3	4	
Количество пациентов в группах (n)		8	7	4	10	
НК-клетки, %	МПК	36,0 [28,8 ÷ 44,2]	25,1 [21,3 ÷ 27,3]	22,9 [11,8 ÷ 41,3]	13,3 [9,9 ÷ 17,8]	p ₁₋₄ =0,001 p ₂₋₄ =0,01
	МПК + K562	31,3 [26,3 ÷ 38,8]	22,4 [18,1 ÷ 32,5]	19,8 [10,8 ÷ 31,0]	12,5 [10,8 ÷ 16,5]	p ₁₋₄ =0,001 p ₂₋₄ =0,05
Т-клетки, %	МПК	62,3 [57,5 ÷ 75,1]	67,9 [62,3 ÷ 75,2]	77,0 [70,0 ÷ 91,0]	74,5 [64,5 ÷ 78,9]	p ₁₋₃ =0,008 p ₂₋₃ =0,02
	МПК + K562	67,3 [61,9 ÷ 72,3]	66,1 [59,8 ÷ 72,8]	78,8 [73,1 ÷ 81,3]	77,5 [74,2 ÷ 81,8]	p ₁₋₃ =0,002 p ₂₋₃ =0,003 p ₁₋₄ =0,001 p ₂₋₄ =0,003

Пр и м е ч а н и е. МПК – мононуклеарные клетки периферической крови, ЗНО – злокачественные новообразования, ИП – инвертированная папиллома, p (M-W) – уровень статистически значимых различий, вычисленный с помощью теста Манна – Уитни.

Выявлено статистически значимое увеличение относительного количества NK-клеток пациентов со злокачественными и доброкачественными новообразованиями по сравнению с контрольной группой в культурах МПК ($p = 0,001$ и $p = 0,01$ соответственно) и ко-культурах с K562 ($p = 0,001$ и $p = 0,05$ соответственно). NK-клетки способны инфильтрировать солидные опухоли, однако в большинстве исследований сообщалось о снижении числа естественных киллеров у пациентов со злокачественными по сравнению с соответствующими доброкачественными новообразованиями. Факторами, влияющими на проникновение NK-клеток в опухоль, являются локализация новообразования, происхождение раковых клеток, а также индивидуальные особенности пациента [14]. Повышенная инфильтрация NK-клеток, основанная на экспрессии CD56 и CD57, служит фактором положительного прогноза у пациентов, страдающих различными солидными злокачественными новообразованиями, например, плоскоклеточным раком головы и шеи, легких, колоректальным раком, аденокарциномой легких [15; 16].

Установлено, что в культурах МПК относительное количество Т-клеток снижалось у пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями относительно группы сравнения ($p = 0,008$ и $p = 0,02$ соответственно), а при совместном культивировании с K562 показатель уменьшался относительно как группы сравнения ($p = 0,002$ и $p = 0,003$ соответственно), так и контрольной группы ($p = 0,001$ и $p = 0,003$ соответственно). При этом статистически значимых различий в относительном количестве Т-клеток в монокультурах МПК и ко-культурах с K562 не обнаружено для всех исследуемых групп.

Для большинства типов рака выявлена положительная связь между инфильтрирующими опухоль цитотоксическими Т-лимфоцитами и благоприятным исходом заболевания. В частности, для синоназальной плоскоклеточной карциномы продемонстрировано увеличение популяции Т-клеток у пациентов без рецидива заболевания по сравнению с пациентами с рецидивом новообразования [17; 18]. Однако в ряде

исследований показано, что высокие уровни инфильтрации эффекторных Т-клеток коррелируют с худшим прогнозом выживаемости и появлению метастаз в лимфатических узлах при злокачественных синоназальных патологиях [19; 20]. Парадоксальное сосуществование большого количества цитотоксических Т-лимфоцитов и прогрессирования новообразования может указывать на функциональное истощение киллерных клеток и существование сложных перекрестных путей взаимодействия между опухолевыми и инфильтрирующими лимфоидными клетками [21].

Экспрессия LAMP-1/CD107a на цитотоксических лимфоидных клетках. Для оценки функционального потенциала киллерных клеток исследована экспрессия гликопротеина лизосомальной мембраны LAMP-1/CD107a на лимфоидных клетках, который представляет собой высокогликозилированный белок массой 40 кДа, способный при активации цитотоксических клеток и высвобождении лизосомальных литических гранул оставаться на поверхности клетки, что может быть использовано в качестве маркера дегрануляции [22].

У пациентов с доброкачественными и злокачественными новообразованиями установлено снижение экспрессии CD107a на NK-клетках относительно группы сравнения в культурах МПК ($p = 0,003$ и $p = 0,001$ соответственно (рис. 1а), верхняя панель гистограмм), в то время как статистически значимые различия отсутствовали по сравнению с контрольной группой. В ко-культурах МПК и K562 пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями и здоровых лиц с клетками-мишенями показана стимуляция дегрануляции NK-клеток, сопровождающаяся статистически значимым увеличением количества CD107a-позитивных клеток ($p = 0,007$, $p = 0,007$ и $p = 0,008$ соответственно). При этом у пациентов с новообразованиями сохранялась аналогичная культурам МПК тенденция к снижению экспрессии CD107a на NK-клетках в ко-культурах с клетками-мишенями относительно группы сравнения ($p = 0,04$ и $p = 0,01$ соответственно, для доброкачественных и злокачественных опухолей (рис. 1б – нижняя панель гистограмм).

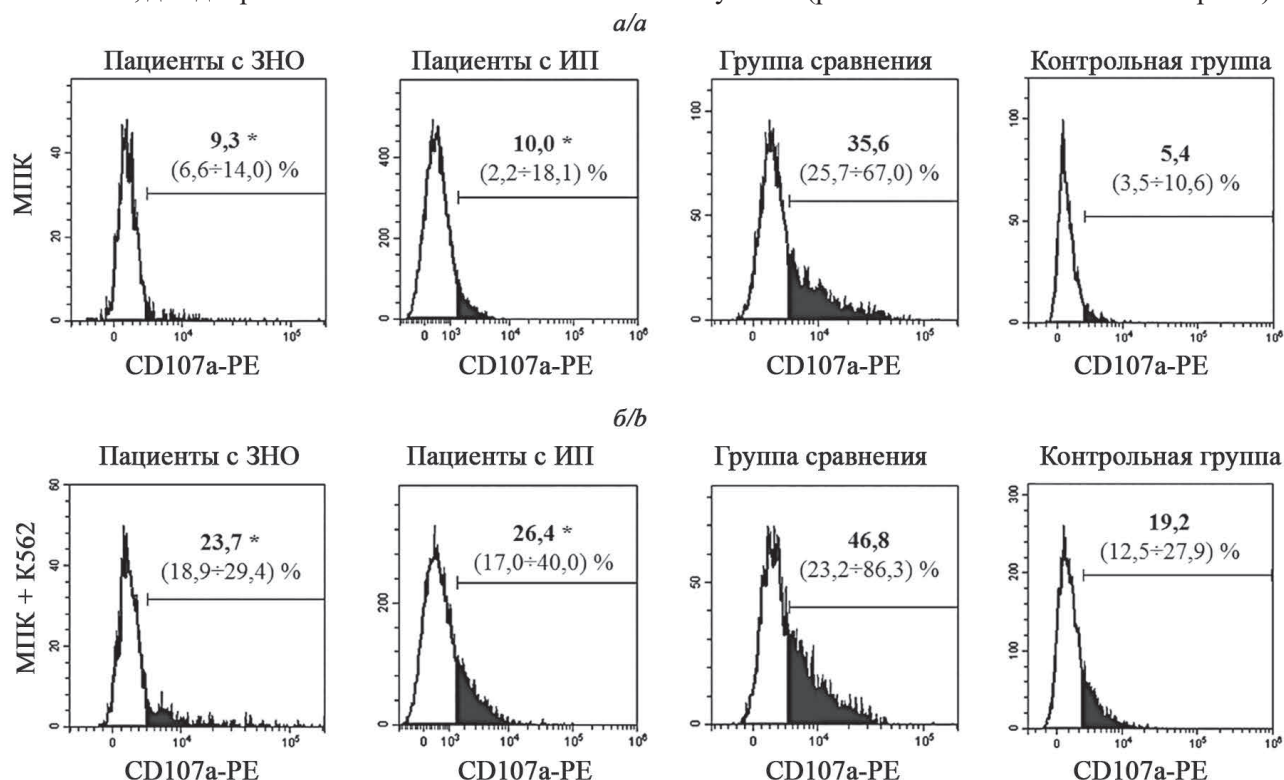


Рис. 1. Экспрессия CD107a на NK-клетках в культурах МПК (а – верхняя панель) и ко-культурах МПК с K562 (б – нижняя панель) исследуемых групп

Примечание. * $p < 0,05$ – статистические значимые различия указаны относительно группы сравнения; МПК – мононуклеарные клетки периферической крови, ЗНО – злокачественные новообразования, ИП – инвертированная папиллома.

Fig. 1. CD107a expression on NK-cells in cultures and co-cultures of PBMCs of the study groups (a – upper panel) and co-cultures of PBMCs with K562 (b – lower panel)

Note. * $p < 0,05$ – statistically significant differences are pointed relative to the comparison group.

Оценка экспрессии CD107a на Т-клетках исследуемых групп показала увеличение количества CD107a⁺ Т-лимфоцитов у пациентов со злокачественными новообразованиями по сравнению с контрольной группой

при спонтанной ($p = 0,02$, рис. 2а – верхняя панель) и индуцированной K562 ($p = 0,001$, рис. 2б – нижняя панель) дегрануляции. Для пациентов с доброкачественными опухолями выявлено снижение экспрессии CD107a относительно группы сравнения в культуре МПК ($p = 0,03$) и увеличение CD107a относительно контрольной группы в ко-культуре МПК и K562 ($p = 0,001$). Необходимо отметить, что НК-клетки в большей степени по сравнению с Т-клетками активировались для индукции грануло-опосредованного апоптоза в клетках-мишенях, что заметно по количеству естественных киллеров, экспрессирующих маркер CD107a.

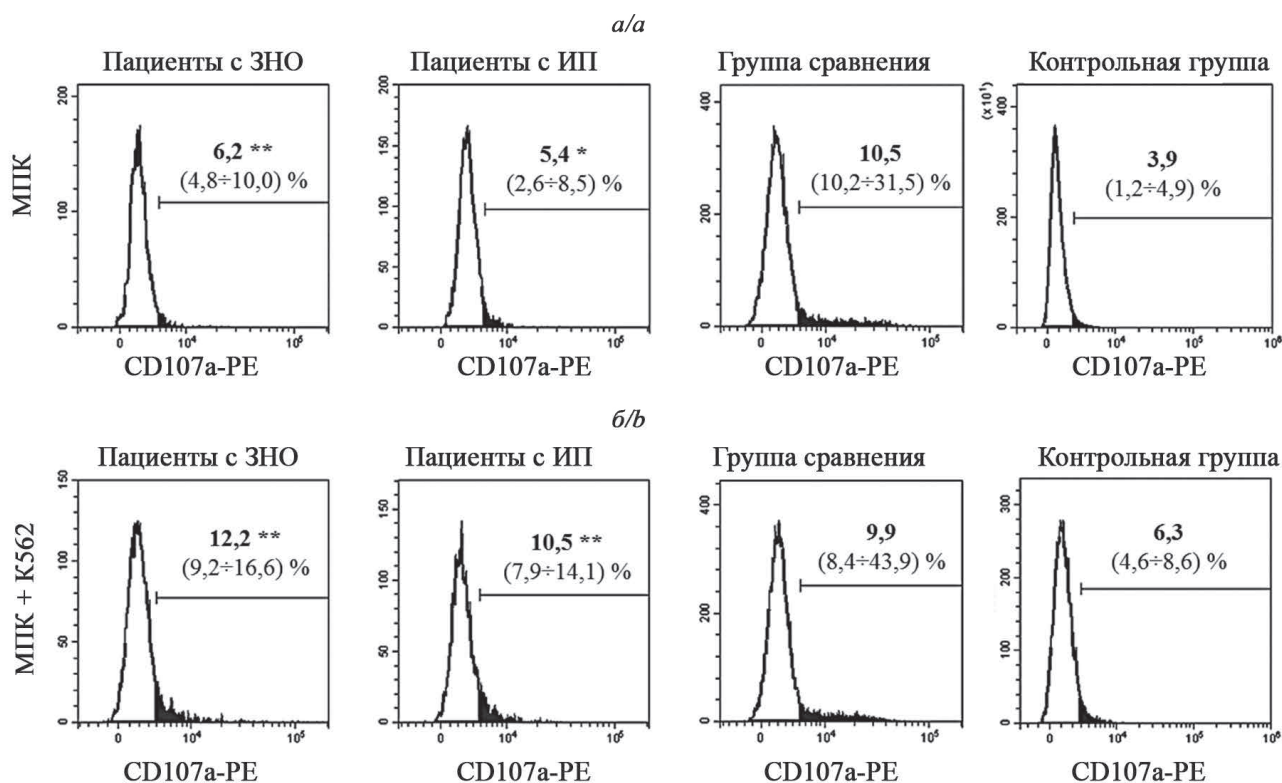


Рис. 2. Экспрессия CD107a на Т-клетках в культурах МПК (а – верхняя панель) и ко-культурах МПК с K562 (б – нижняя панель) исследуемых групп

Примечание. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,05$ – статистические значимые различия указаны относительно группы сравнения и контрольной группы, соответственно; МПК – мононуклеарные клетки периферической крови, ЗНО – злокачественные новообразования, ИП – инвертированная папиллома.

Fig. 2. CD107a expression on T-cells in cultures of PBMCs (a – upper panel) and co-cultures of PBMCs with K562 (b – lower panel) of the study groups

Note. * $p < 0,05$ and ** $p < 0,05$ – statistically significant differences are pointed relative to the comparison group and control group, respectively.

CD107a, как и трансмембранный белок типа I, не только отвечает за поддержание структурной целостности лизосом и стабильности pH внутри лизосом, но также участвует в различных внутриклеточных физиологических процессах, таких как регуляция лизосомального цитозольного экзоцитоза и транспорта холестерина, направленного перемещения перфорины к литическим гранулам. Появляется все больше доказательств того, что CD107a участвует в иммунной дисрегуляции [29; 30]. Считается, что высокогликозилированная часть молекулы на люминальной стороне литической гранулы участвует в защите клеточной мембраны от атаки ферментов в гранулах и, таким образом, может впоследствии защищать мембрану эффекторной клетки после дегрануляции, что происходит за счет уменьшения связывания перфорины с мембраной цитотоксических клеток в иммунологическом синапсе [8]. Следовательно, LAMP-1/CD107a является не просто маркером активации и дегрануляции цитотоксических клеток, но представляет собой важный компонент в реализации эффекторных механизмов цитотоксичности.

Наряду с этим, между количеством CD107a-позитивных Т-клеток и степенью злокачественности заболевания обнаружена умеренная положительная корреляционная зависимость ($R = 0,48$; $p = 0,009$). Аналогичная взаимосвязь транскрипционной активности гена у пациентов с новообразованиями головного мозга установлена в исследованиях Qui и соавт. (2023) [23] и Sarafian и соавт. (2018) [24], выявивших связь высокой экспрессии CD107a с локальной прогрессией опухоли и низкой общей выживаемостью [23; 24].

Корреляция между малигнизацией новообразования и повышенной экспрессией CD107a также показана у пациентов с раком молочной железы, карциномой поджелудочной железы и колоректальным раком [25–27]. Недавние исследования выявили, что при некоторых воспалительных заболеваниях, например, аутоиммунном волчаночном нефрите, существует положительная связь между процентным содержанием CD107a+ Т-клеток и индексом активности системной красной волчанки, а внутрипочечная экспрессия CD107a достоверно коррелирует с протеинурией [28]. Таким образом, появляется все больше доказательств того, что CD107a может стать будущей терапевтической мишенью для воздействия на цитотоксические клетки.

Внутриклеточная продукция гранзима В цитотоксическими лимфоидными клетками. Для характеристики грануло-опосредованного киллинга опухолевых клеток проведено исследование спонтанной и стимулированной внутриклеточной продукции ключевого гранзима В, инициирующего апоптоз-индуцированную клеточную гибель, в исследуемых группах пациентов. Показано снижение внутриклеточной продукции гранзима В NK-клетками (рис. 3) у пациентов с опухолями по сравнению с контрольной группой в культурах МПК ($p = 0,05$ и $p = 0,05$ соответственно) и совместных культурах МПК и K562 ($p = 0,01$ и $p = 0,03$ соответственно). При этом выявлено, что у пациентов с доброкачественными новообразованиями уровень гранзима В уменьшался более выражено, чем в группе пациентов со злокачественными опухолями ($p = 0,05$ в культурах МПК и $p = 0,02$ – в ко-культурах МПК и K562). При этом совместное культивирование МПК с опухолевой клеточной линией K562 у пациентов с новообразованиями не приводила к статистически значимому снижению содержания гранзима В в цитоплазме (дегрануляции) NK-клеток по сравнению с контрольной группой ($p = 0,05$), что свидетельствует об истощении пула гранзим В+ NK-клеток у пациентов с синоназальными опухолями.

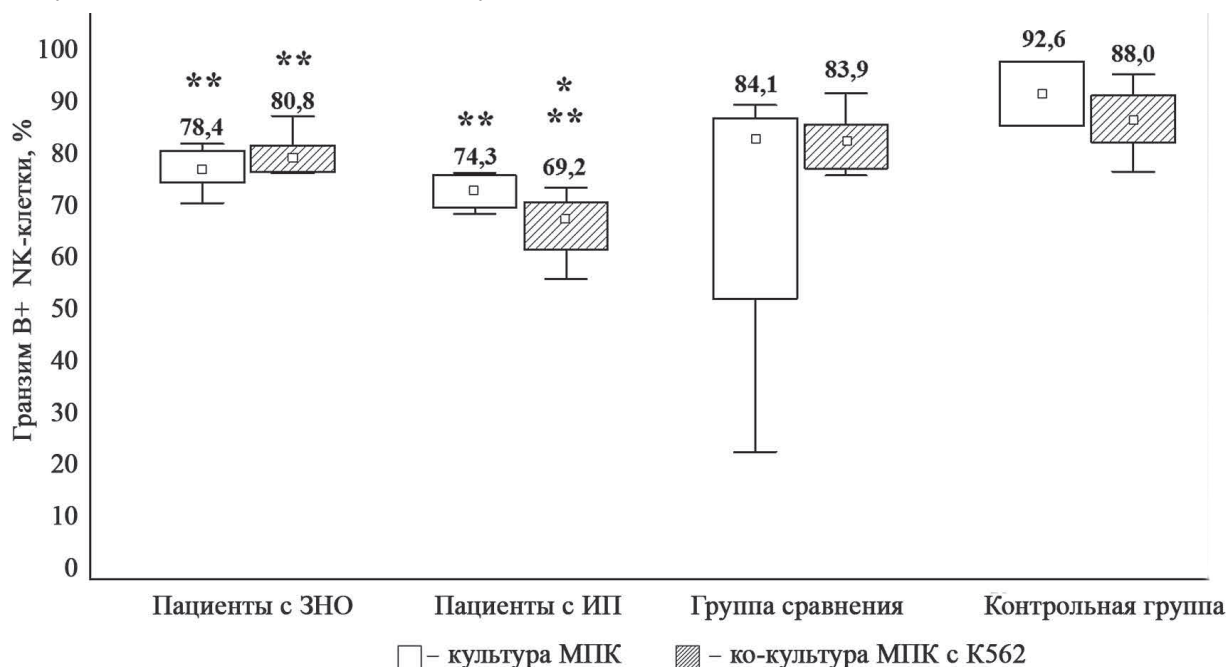


Рис. 3. Внутриклеточная продукция гранзима В NK-клетками в культурах исследуемых групп

Примечание. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,05$ – статистические значимые различия указаны относительно группы сравнения и контрольной группы соответственно; МПК – мононуклеарные клетки периферической крови, ЗНО – злокачественные новообразования, ИП – инвертированная папиллома.

Fig. 3. Granzyme B intracellular production by NK-cells in cultures of the study groups

Note. * $p < 0,05$ and ** $p < 0,05$ – statistically significant differences are pointed relative to the comparison group and control group, respectively.

Оценка продукции гранзима В Т-клетками исследуемых групп (рис. 4) показала увеличение его количества у пациентов со злокачественными новообразованиями по сравнению с контрольной группой и группой сравнения при спонтанной ($p = 0,05$ и $p = 0,01$ соответственно) и индуцированной K562 ($p = 0,05$ и $p = 0,001$ соответственно) дегрануляции. Для пациентов с доброкачественными опухолями установлено увеличение уровня гранзима В относительно контрольной группы в культуре МПК ($p = 0,05$) и относительно группы сравнения в ко-культуре МПК и K562 ($p = 0,05$). Положительная корреляционная зависимость выявлена между степенью злокачественности заболевания и количеством продуцирующих

гранзим В Т-клеток ($R = 0,40$; $p = 0,03$). Отсюда следует, что у пациентов со злокачественными синоназальными новообразованиями эффекторные Т-клетки активнее вовлекаются в противоопухолевый ответ, используя механизм грануло-опосредованной цитотоксичности, позволяя использовать субпопуляции гранзим В-позитивных Т-клеток в качестве прогностических маркеров малигнизации опухолевого процесса.

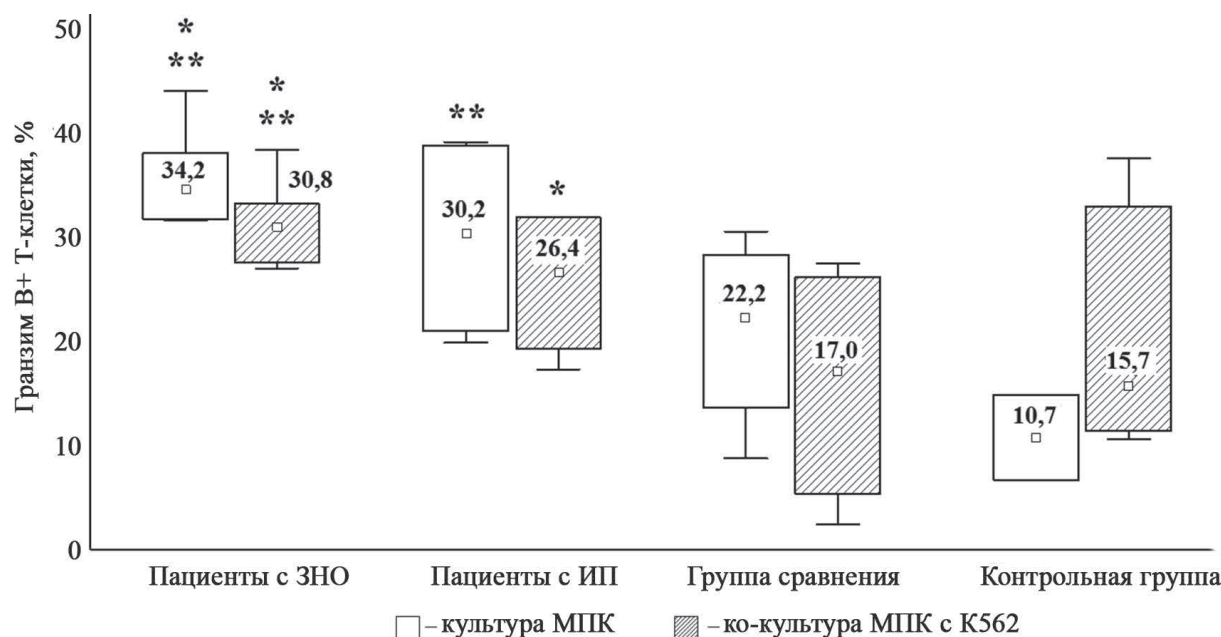


Рис. 4. Внутриклеточная продукция гранзима В Т-клетками в культурах исследуемых групп

Примечание. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,05$ – статистические значимые различия указаны относительно группы сравнения и контрольной группы соответственно; МПК – мононуклеарные клетки периферической крови, ЗНО – злокачественные новообразования, ИП – инвертированная папиллома.

Fig. 4. Granzyme B intracellular production by T-cells in cultures of the study groups

Note. * $p < 0,05$ and ** $p < 0,05$ – statistically significant differences are pointed relative to the comparison group and control group, respectively.

Гранзимы представляют собой семейство сериновых протеаз. У человека идентифицировано 5 белков-гранзимов (А, В, Н, К и М), при этом каждый гранзим обладает уникальными протеазными характеристиками с различной субстратной специфичностью. Широкий спектр активности гранзимных протеаз индуцирует различные пути апоптоза каспазо-зависимым и независимым образом. При дегрануляции цитотоксические клетки выделяют несколько разных гранзимов, поэтому гибель клетки-мишени, вероятно, является результатом их совместного действия [2; 31]. Однако показано, что только гранзим В в сочетании с перфорином одновременно необходим и достаточен для индукции апоптоза в опухолевых клетках [1].

Хотя в механизмах продукции гранзима В существует избыточность из-за его цитотоксической природы, продукция и секреция молекулы строго регулируются как на транскрипционном, так и на трансляционном уровне [32]. Последние исследования свидетельствуют о том, что уровень экспрессии и количество клеток, продуцирующих гранзим В, связаны с прогнозом онкологических заболеваний. Например, высокая плотность гранзим В-позитивных клеток в микроокружении опухоли может иметь благоприятный эффект при плоскоклеточном раке полости рта, предотвращая распространение метастазов и улучшая прогноз выживаемости пациентов [33]. Инфильтрация цитотоксических Т-лимфоцитов и повышенная доля активированных клеток, экспрессирующих гранзим В, связаны с увеличением выживаемости среди пациентов с колоректальным раком [34]. Таким образом, количество цитотоксических клеток, экспрессирующих гранзим В, может являться полезным прогностическим маркером течения и исхода заболевания при синоназальных новообразованиях.

Заключение

В результате проведенных исследований выявлено, что субпопуляционный состав цитотоксических клеток у пациентов с доброкачественными и злокачественными синоназальными новообразованиями характеризуется повышением количества НК-клеток и снижением количества Т-клеток по сравнению со здоровыми лицами. При этом функциональная характеристика киллерных клеток свидетельствует, что

в присутствии опухолевой клеточной линии K562 наблюдается снижение экспрессии CD107a и продукции гранзима В НК-клетками как у пациентов с доброкачественными, так и со злокачественными опухолями относительно группы сравнения и здоровых лиц, что может указывать на возможные нарушения или невосприимчивость механизмов активации цитотоксичности в НК-клетках пациентов с синоназальными новообразованиями. Наряду с этим, для пациентов со злокачественными опухолями характерно повышение количества CD107a- и гранзим В-позитивных Т-лимфоцитов в ко-культурах МПК и K562 по сравнению с контрольной группой, что коррелирует с увеличением степени малигнизации опухолевого процесса и может быть использовано в качестве прогностических маркеров прогрессии синоназальной онкопатологии. Таким образом, проведенные исследования позволили охарактеризовать эффекторные механизмы цитотоксичности лимфоидных клеток в патогенезе доброкачественных и злокачественных синоназальных новообразований, что может использоваться при разработке новых и усовершенствовании уже имеющихся подходов прогноза динамики развития опухолей полости носа и иммунотерапии.

Библиографические ссылки / References

1. Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*. 2019;105(6):1319–1329. DOI: 10.1002/JLB.MR0718-269R.
2. Ham H, Medlyn M, Billadeau DD. Locked and Loaded: Mechanisms Regulating Natural Killer Cell Lytic Granule Biogenesis and Release. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1–19. DOI: 10.3389/fimmu.2022.871106.
3. Baldari CT, Valitutti S, Dustin ML. Editorial: Mechanisms of lymphocyte mediated cytotoxicity in health and disease. *Frontiers in Immunology*. 2023;14:1–3. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1226870.
4. Trapani JA. Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death and Differentiation*. 2012;19(1):21–27. DOI: 10.1038/cdd.2011.156.
5. Wang H, Huang Y, He J. Dual roles of granzyme B. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2021;94(3):1–19. DOI: 10.1111/sji.13086.
6. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(5):361–370. DOI: 10.1038/nri1083.
7. Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*. 2013;122(8):1411–1418. DOI: 10.1182/blood-2012-07-441832.
8. Johnson DE, Burtneess B, Leemans CR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1):1–22. DOI: 10.1038/s41572-020-00224-3.
9. Tan Y, Wang Z, Xu M. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. *International Journal of Oral Science*. 2023;15(1):1–23. DOI: 10.1038/s41368-023-00249-w.
10. Lisan Q, Laccourreye O, Bonfils P. Sinonasal inverted papilloma: From diagnosis to treatment. *European Annals of Otorhinolaryngology. Head and Neck Diseases*. 2016;133(5):337–341. DOI: 10.1016/j.anorl.2016.03.006.
11. Windon MJ, D'Souza G, Rettig EM. Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer*. 2018;124(14):2993–2999. DOI: 10.1002/cncr.31385.
12. Re M, Gioacchini FM, Bajraktari A. Malignant transformation of sinonasal inverted papilloma and related genetic alterations: a systematic review. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2017;274(8):2991–3000. DOI: 10.1007/s00405-017-4571-2.
13. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Molecular Cancer*. 2019;18(1):1–24. DOI: 10.1186/s12943-019-0983-5.
14. Guilleroy C. NK Cells in the Tumor Microenvironment. *Tumor Microenvironment, Springer International Publishing*. 2020;1273:69–90. DOI: 10.1007/978-3-030-49270-0_4.
15. Gutkin DW, Shurin MR. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2014;63(1):45–57. DOI: 10.1007/s00262-013-1480-0.
16. Bisheshar SK, De Ruiter EJ, Devriese LA. The prognostic role of NK cells and their ligands in squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1–10. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1747345.
17. Rossi F, Fredericks N, Snowden A. Next Generation Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1–19. DOI: 10.3389/fimmu.2022.886429.
18. Gu JT, Claudio N, Betts C. Characterization of the tumor immune microenvironment of sinonasal squamous-cell carcinoma. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2022;12:39–50. DOI: 10.1002/alr.22867.
19. Takahashi Y, Amit M, Gleber-Netto FO. Evaluation of the Immune Microenvironment in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma and Its Association with Patients' Survival. *Journal of Neurological Surgery, Part B: Skull Base*. 2021;82(2):22. DOI: 10.1055/s-0041-1725265.
20. Villanueva-Fernández E, Hermsen MA, Suárez-Fernández L. Biomarkers for Immunotherapy in Poorly Differentiated Sinonasal Tumors. *Biomedicines*. 2022;10:1–16. DOI: 10.3390/biomedicines10092205.
21. García-Marín R, Reda S, Riobello C. Prognostic and Therapeutic Implications of Immune Classification by CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22:1–11. DOI: 10.3390/ijms22136926.
22. Quan H, Yan L, Wang S. Clinical relevance and significance of programmed death-ligand 1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, and p16 status in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer Management and Research*. 2019;11:4335–4345. DOI: 10.2147/CMAR.S201568.
23. Malkova AM. Laboratory biomarkers of an effective antitumor immune response. Clinical significance. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2021;29:1–11. DOI: 10.1016/j.ctarc.2021.100489.
24. Qiu XF, Chen X. LAMP1/2 as potential diagnostic and prognostic marker for brain lower grade glioma: *Medicine*. 2023;102(33):1–11. DOI: 10.1097/MD.00000000000034604.

25. Sarafian VS, Koev I, Mehterov N. LAMP-1 gene is overexpressed in high grade glioma. *APMIS*. 2018;126(8):657–662. DOI: 10.1111/apm.12856.
26. Wang Q, Yao J, Jin Q. LAMP1 expression is associated with poor prognosis in breast cancer. *Oncology Letters*. 2017;14(4):4729–4735. DOI: 10.3892/ol.2017.6757.
27. Künzli BM, Berberat PO, Zhu ZW. Influences of the lysosomal associated membrane proteins (Lamp-1, Lamp-2) and Mac-2 binding protein (Mac-2-BP) on the prognosis of pancreatic carcinoma. *Cancer*. 2002;94(1):228–39. DOI: 10.1002/cncr.10162.
28. Furuta K, Ikeda M, Nakayama Y. Expression of lysosome-associated membrane proteins in human colorectal neoplasms and inflammatory diseases. *The American Journal of Pathology*. 2001;159(2):449–55. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61716-6.
29. Wiechmann A, Wilde B, Tyczynski B. CD107a+ (LAMP-1) Cytotoxic CD8+ T-Cells in Lupus Nephritis Patients. *Frontiers in Medicine*. 2021;8:1–9. DOI: 10.3389/fmed.2021.556776.
30. Deng S, Feng X, Yang M. LAMP1 as a novel molecular biomarker to predict the prognosis of the children with autism spectrum disorder using bioinformatics approaches. *Scientific Reports*. 2023;3(1):1–10. DOI: 10.1038/s41598-023-40617-4.
31. Krzewski K, Gil-Krzewska A, Nguyen V. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood*. 2013;121(23):4672–4683. DOI: 10.1182/blood-2012-08-453738.
32. Ewen CL, Kane KP, Bleackley RC. A quarter century of granzyme. *Cell Death and Differentiation*. 2012;9(1):28–35. DOI: 10.1038/cdd.2011.153.
33. Tibbs E, Cao X. Emerging Canonical and Non-Canonical Roles of Granzyme B in Health and Disease. *Cancers*. 2022;14(6):1–15. DOI: 10.3390/cancers14061436.
34. Taghavi N, Khaleghjou A, Mahdavi N. Correlation of P53 and granzyme B expression in oral squamous cell carcinoma with clinicopathologic findings. *Archives of Iranian Medicine*. 2013;16(9):498–502.
35. Prizment AE, Vierkant RA, Smyrk TC. Cytotoxic T Cells and Granzyme B Associated with Improved Colorectal Cancer Survival in a Prospective Cohort of Older Women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2017;26(4):622–631. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0641.

Статья поступила в редколлегию 31.07.2024.
Received by editorial board 31.07.2024.