

МНПК ($16,695 \pm 2,260$)% у хворих на НГЛ, ($p < 0,1$ в обох випадках). Показники ІЦ НК з МНЛВ перебували у незначній позитивній кореляції з концентрацією TNF у КЖС МНЛВ ($r = 0,174$) і статистично вірогідно корелювали з концентрацією TGF β 1 ($r = 0,701$). При цьому ІЦ НК з МНПК хворих на НГЛ негативно корелював з концентрацією TNF у плазмі крові ($r = -0,495$) і концентрацією TNF у КЖС МНПК ($r = -0,548$). ІЦ НК з МНПК здорових осіб також перебував у негативній кореляції з концентрацією TNF у КЖС МНПК ($r = -0,442$), однак рівень TNF у плазмі крові здорових осіб, на відміну від хворих на НГЛ, перебував у незначній позитивній залежності з активністю НК з МНПК ($r = 0,271$). ІЦ НК з МНПК при НГЛ перебував у позитивній залежності з концентрацією TGF β 1 у плазмі крові ($r = 0,619$) і в негативній – із вмістом TGF β 1 у КЖС МНПК ($r = -0,620$). Проведені дослідження можуть свідчити про важливу роль порушень співвідношення локальної секреції TNF та TGF β 1 МНПК, МНЛВ і МНС в регуляції імунної відповіді при НГЛ, зокрема, активності НК у протипухлинному захисті.

Ключові слова: TNF, TGF β 1, НК, лімфома, селезінка, лімфатичні вузли.

СЕКРЕЦИЯ ФАКТОРА НЕКРОЗОАПУХОЛЕЙ (TNF), ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА БЕТА 1 (TGF β 1) И ЕСТЕСТВЕННАЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ У БОЛЬНЫХ ЛИМФОМОЙ С ПОРАЖЕНИЕМ СЕЛЕЗЕНКИ

**В.А. Барилка, В.Л. Матлан*, Ю.Л. Евстахевич,
И.И. Евстахевич, В.Е. Логинский**

ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН Украины», Львов

*Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

Резюме. Патогенетическая роль TNF и TGF β 1 в развитии цитотоксических эффектов и активности естественных киллеров (НК) в лимфатических узлах (ЛУ) и пораженной лимфомой селезенке изучены недостаточно. С этой целью сравнивали содержание TNF и TGF β 1 в плазме крови, кондиционированных питательных средах (КПС) мононуклеаров (МН) периферической крови (МНПК), МН лимфатических узлов (МНЛУ) и МН ткани селезенки (МНС) у 10 пациентов с неходжкинской лимфомой (НХЛ) селезенки и 11 – с первичным поражением ЛУ. Определение содержания цитокинов выполнялось биологическими методами. Полученные результаты анализировались во взаимосвязи с цитотоксической активностью НК против клеток острого эритромиелоза человека линии K562, меченных H³-метилтимидином. Установлено, что индекс цитотоксичности (ИЦ) НК из МНС ($29,275 \pm 7,920$)% был достоверно выше, чем показатели ИЦ НК из МНЛУ ($15,855 \pm 3,800$)% и МНПК ($16,695 \pm 2,260$)% больных с НХЛ, ($p < 0,1$ в обоих случаях). Показатели ИЦ НК МНЛУ имели незначительную положительную корреляцию с концентрацией TNF в КПС МНЛУ ($r = 0,174$) и

статистически достоверно коррелировали с концентрацией TGF β 1 ($r = 0,701$). При этом ИЦ НК из МНПК пациентов с НХЛ пребывал в отрицательной зависимости с содержанием TNF в плазме крови ($r = -0,495$) и концентрацией TNF в КПС МНПК ($r = -0,548$). ИЦ НК из МНПК у здоровых людей также отрицательно коррелировал с концентрацией TNF в КПС МНПК ($r = -0,442$), однако уровень TNF в плазме крови здоровых лиц, в отличие от больных с НХЛ, пребывал в незначительной положительной корреляции с активностью НК из МНПК ($r = 0,271$). ИЦ НК из МНПК при НХЛ положительно коррелировал с концентрацией TGF β 1 в плазме крови ($r = 0,619$) и отрицательно – с содержанием TGF β 1 в КПС МНПК ($r = -0,620$). Таким образом, проведенные исследования могут свидетельствовать о важной роли локальной секреции TNF и TGF β 1 МНПК, МНЛВ и МНС в регуляции иммунного ответа при НХЛ, в частности, активности НК в противоопухолевой защите организма.

Ключевые слова: TNF, TGF β 1, НК, лимфома, селезенка, лимфатические узлы.

THE PRODUCTION OF TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF), TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 (TGF β 1) AND NATURAL CYTOTOXICITY IN LYMPHOMAS (NHL) PATIENTS WITH SPLEEN AFFECTION

V.A. Barilka, V.L. Matlan*, Y.L. Yevstachevich,
I.Y. Yevstachevich, V.Y. Loginsky

State Institution «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Lviv

*Danylo Halytsky National Medical University, Lviv, Ministry of Health of Ukraine.

Summary. *The pathogenetic significance of both cytokines TNF and TGF β 1 in development of cytotoxic activity of natural killer cells (NK) in lymphnodes (LN) and spleen of patients (pts) NHL's are not fully studied.*

Aim: *to detect the concentration of TNF and TGF β 1 by biological methods in plasma, supernatants (Sp) of mononuclear cells (MC) from peripheral blood (MCPB), MC from lymphnodes (MCLN) and MC from spleen (MNS) in 10 patients with splenic NHL and 11 – with primary affected LN. The obtained data were compared with the results in controls and were analyzed in relation with in cytotoxic activity (IC) of NK against K562 cells marked with H^3 -methylthymidin.*

Results. *The IC of NK in suspension of MNS ($29,275 \pm 7,920$)% was statistically higher than IC in Sp both of MNLN ($15,855 \pm 3,800$)% and of MCPB ($16,695 \pm 2,260$)% in NHL pts ($p < 0,1$). The IC of NK from MCLN slightly correlated with the concentration of TNF in Sp of MCLN ($r = 0,174$) and significantly correlated with the concentration of TGF β 1 ($r = 0,701$). The IC of NK from MCPB in NHL pts negatively correlated with the concentration of TNF both in plasma ($r = -0,495$) and in Sp of MCPB ($r = -0,548$). The IC of NK from MCPB in 15 healthy donors negatively*

correlated with the concentration of TNF in Sp of MCPB ($r = -0,442$). However the level of TNF in plasma of healthy donors positively correlated with IC of NK from MCPB ($r = 0,271$) as compared with NHL. The IC of NK from MCPB positively correlated with the concentration of TGF $\beta 1$ in plasma ($r = 0,619$) of NHL pts and negatively – with TGF $\beta 1$ in Sp of MCPB ($r = -0,620$).

Conclusions: *The achieved results make it possible to consider the important role of local production of TNF and TGF $\beta 1$ by MCPB, MCLN, MCS in regulation of immune responses in NHL pts, in particular of antitumor NK activity.*

Key words: TNF, TGF $\beta 1$, NK, lymphomas, spleen, lymphnodes.

Механізм, через який пухлина уникає імунного контролю, вивчений недостатньо і, на думку авторів, до цього можуть бути причетними порушення цитокинової регуляції, зокрема, секреції TNF та TGF $\beta 1$, порушення активності природних кілерів (NK) [3, 5]. Надекспресія цих протеїнів часто асоційована з несприятливим прогнозом у хворих на НГЛ [2]. Поряд з цим, патогенетичну роль TNF і TGF $\beta 1$ у розвитку цитотоксичних ефектів НК в уражених лімфою лімфатичних вузлах чи селезінці вивчено недостатньо [3, 6, 8].

Метою роботи було визначити концентрацію TNF та TGF $\beta 1$ у плазмі у співвідношенні з їх продукцією мононуклеарами (МН) периферичної крові (МНПК), МН з лімфатичних вузлів (МНЛВ) та МН з ураженої селезінки (МНС) у хворих на НГЛ; отримані результати порівняти з нормальними показниками та з цитотоксичною активністю НК у цих тканинах.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проведено у 21 хворого на НГЛ, серед яких було 10 осіб з первинним ураженням селезінки, яким проведено спленектомію, і 11 пацієнтів з первинним ураженням лімфатичних вузлів. Контрольну групу склали 8 пацієнтів з реактивною гіперплазією селезінки (РГС), 7 – з неспецифічним реактивним лімфаденітом (НРЛ) і 15 здорових осіб – донорів крові.

Плазму отримували з периферичної крові, стабілізованої гепарином, і зберігали при -20°C до часу визначення концентрації цитокінів. МНПК отримували з венозної гепаринізованої крові. МНЛВ і МНС отримували після оперативного видалення ЛВ або селезінки та механічного їх подрібнення в стерильних умовах. МН із суспензії клітин виділяли у градієнті щільності фікол-верографіну ($\rho = 1,077$). Одну порцію отриманих МН використовували для проведення тесту цитотоксичності, а іншу – для отримання кондиціонованих живильних середовищ (КЖС), як описано раніше [1]. У випадку визначення концентрації TNF використовували культуру мишачих фібробластів лінії L929, чутливу до проапоптичної дії фактора, яку мітили перед експериментом H^3 -метилтимідином (Amersham, Великобританія) [7]. Концентрацію TGF $\beta 1$ визначали з використанням культури мічених H^3 -метилтимідином

клітин епітелію легенів норки лінії CCL64, на які TGF β 1 має ристінгібіторний вплив [4]. Для визначення цитотоксичної активності NK (клітин-ефекторів) використовували нативні суспензії МНПК, МНЛВ або МНС, з яких NK не ізолювали, враховуючи кооперативну взаємодію клітин у розвитку імунної відповіді. Мішенями слугували клітини еритромієлозу людини лінії K562, які перед експериментом мітили H^3 -метилтимідином, як було описано раніше [1]. Отримані результати аналізували методами варіаційної статистики, їх вірогідність оцінювали за допомогою критерію Стьюдента (t).

Результати та їх обговорення. Результати дослідження концентрації TNF, TGF β 1 у дослідних взірцях хворих на НГЛ і в контрольній групі наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Концентрація TNF і TGF β 1 у хворих на НГЛ (M \pm m)

Джерело цитокінів	Кількість досліджень	Концентрація TNF, нг/мл	Концентрація TGF β 1, нг/мл
Хворі на НГЛ:			
Плазма крові	21	1,252 \pm 0,440*	3,685 \pm 0,730*
КЖС МНПК	16	0,192 \pm 0,050*	3,730 \pm 0,900*
КЖС МНС	10	0,235 \pm 0,120	4,860 \pm 0,610*
КЖС МНЛВ	15	0,190 \pm 0,070	6,268 \pm 0,710
Контрольна група:			
Плазма крові донорів	15	0,086 \pm 0,014	2,110 \pm 0,380
КЖС МНПК донорів	15	0,069 \pm 0,001	7,850 \pm 0,800
КЖС МНС при РГС	8	0,142 \pm 0,030	8,330 \pm 0,531
КЖС МНЛВ при НРЛ	7	0,204 \pm 0,450	5,390 \pm 0,140

Примітка.

* – статистично істотна різниця в порівнянні з показниками в контрольній групі (p < 0,05).

Встановлено, що рівень TNF у плазмі крові і в КЖС МНПК хворих на НГЛ був вірогідно вищий, ніж аналогічні показники у здорових осіб (p < 0,001 в обох випадках). Концентрація TNF в КЖС МНЛВ хворих на НГЛ практично не відрізнялася від показників в КЖС МНЛВ при НРЛ. Вміст TNF у КЖС МНС при ураженні лімфою селезінки дещо перевищував аналогічний показник при РГС без статистично вірогідної різниці. Привертає увагу, що співвідношення продукції TNF МНПК, МНЛВ і МНС до його рівня у плазмі крові при НГЛ значно нижче (відповідно 0,15; 0,15 і 0,19) порівняно із контрольною групою (відповідно 0,77; 2,37 і 1,65).

Концентрація TGF β 1 у плазмі крові пацієнтів з НГЛ була помітно вищою, ніж в контролі ($p < 0,05$). Концентрація TGF β 1 у КЖС МНПК при НГЛ була вірогідно нижчою, ніж в КЖС МНПК здорових осіб ($p < 0,05$). Рівень TGF β 1 у КЖС МНС у хворих на НГЛ також був вірогідно нижчим, ніж в КЖС МНС при РГС ($p < 0,05$). Концентрація TGF β 1 у КЖС МНЛВ при НГЛ статистично не відрізнялася від аналогічного показника при НРЛ. Співвідношення продукції TGF β 1 МНПК, МНЛВ і МНС до його рівня у плазмі крові при НГЛ було нижчим (відповідно 1,01; 1,70 і 1,32) в порівнянні з контрольною групою (відповідно 3,72; 3,95 і 2,55). Різниця між цими величинами у дослідній і контрольній групах для TGF β 1 була меншою, ніж для TNF.

Результати дослідження активності НК після спільної інкубації з алогенними клітинами-мішенями K562 наведено у табл. 2.

Показники індексу цитотоксичності (ІЦ) НК з МНПК і МНЛВ при НГЛ практично не відрізнялися між собою, однак в обох випадках були вірогідно нижчими, ніж показник ІЦ НК МНПК у здорових осіб ($p < 0,05$). В той же час показник ІЦ НК з МНС при НГЛ був вірогідно вищий, ніж показники ІЦ НК з МНПК чи МНЛВ ($p < 0,01$, в обох випадках).

Таблиця 2

Показники індексу цитотоксичності НК з МНПК, МНС, МНЛВ проти алогенних клітин лінії K562

Джерело ефекторних НК	Кількість досліджень	ІЦ НК (%) ($M \pm m, \min-max$)
МНПК хворих НГЛ	16	16,695 \pm 2,260* (2,370 – 29,700)
МНС хворих НГЛ	6	29,275 \pm 7,920** (18,400 – 59,800)
МНЛВ хворих НГЛ	6	15,855 \pm 3,800* (4,540 – 31,400)
МНПК здорових осіб	15	22,240 \pm 0,840 (20,200 – 24,800)

Примітки:

* – вірогідно нижчі показники ІЦ НК порівняно з ІЦ НК МНПК здорових осіб ($p < 0,05$);

** – вірогідно вищі показники ІЦ НК з МНС при НГЛ порівняно з ІЦ НК з МНЛВ і з МНПК ($p < 0,01$, в обох випадках).

Цитотоксична активність НК з МНПК хворих на НГЛ негативно корелювала з концентрацією TNF у плазмі крові ($r = -0,495$) і

концентрацією TNF у КЖС МНПК ($r = -0,548$). ІЦ НК з МНПК хворих перебував у позитивній залежності з концентрацією TGF β 1 у плазмі крові ($r = 0,619$) і в негативній – із вмістом TGF β 1 у КЖС МНПК ($r = -0,620$).

ІЦ НК з МНПК здорових осіб перебував у негативній кореляції з концентрацією TNF у КЖС МНПК ($r = -0,442$), однак рівень TNF у плазмі крові здорових осіб, на відміну від НК з МНПК пацієнтів з НГЛ, виявляв незначну позитивну залежність з активністю НК ($r = 0,271$).

Показники ІЦ НК з МНЛВ виявляли слабку позитивну кореляцію з концентрацією TNF у КЖС МНЛВ ($r = 0,174$) і значною мірою залежали від концентрації TGF β 1 ($r = 0,701$).

Рівні TNF та TGF β 1 у КЖС МНС хворих перебували у слабкому негативному корелятивному зв'язку з активністю НК з МНС ($r = -0,225$ і $r = -0,289$, відповідно). Концентрація TNF у КЖС МНС також негативно корелювала з вмістом TNF в плазмі крові пацієнтів ($r = -0,196$).

Отримані результати засвідчили вірогідно вищий рівень TNF у плазмі крові хворих на НГЛ, ніж у контролі. У нашому дослідженні важливим джерелом секреції цитокіну в крові пацієнтів з НГЛ могли бути МНПК, МНС і МНЛВ, які здатні секретувати TNF у живильні середовища [2, 6]. Вважається, що TNF може безпосередньо індукувати цитоліз неопластичних клітин через приєднання лігандів до рецепторів апоптозу, TNFR1, CD95+ (Fas/Apo-1) на клітинах-мішенях або діяти опосередковано, зокрема, активуючи НК [6]. Поряд з цим, накопичення цитокіну спостерігається при багатьох неоплазіях і, всупереч цитотоксичним властивостям, вважається негативною прогностичною ознакою [2, 3]. При НГЛ цей фактор може конститутивно секретуватися пухлинними клітинами внаслідок мутації у кодуючих генах або посередниках у сигнальних шляхах TNF, а також різними клітинами організму у відповідь на неопластичний процес [8]. З іншого боку, у нашому дослідженні виявилось, що рівень TNF у КЖС МНС і МНЛВ при НГЛ статистично не відрізнялися від вмісту цитокіну у КЖС МНС при РГС і МНЛВ при НРЛ. Ці дані могли б вказувати на недостатню продукцію TNF при НГЛ, що може бути важливою умовою виживання пухлинних клітин, які поширюються із плином лімфи [2]. Низька цитотоксичність проти аутологічних неопластичних клітин про демонстрована на ЛВ при раку грудної залози, шлунка, меланомі, пухлинах голови і шиї [3]. Імунну толерантність пов'язують із низьким рівнем TNF у ЛВ, який зазвичай продукується при запаленні Т-хелперними лімфоцитами прозапального типу (Th1, CD4⁺CD8⁺). У ЛВ при НГЛ ці клітини могли зазнавати апоптозу, витіснятися пухлинним клоном або протизапальним типом Т-лімфоцитів (Th2, CD8⁺CD25⁺). Останні здатні продукувати розчинні форми рецепторів TNF (sTNFR1, sTNFR2), і TGF β 1, які належать до антагоністів прозапальної активності TNF [3, 4].

Показано, що TGF β 1 разом з інтерлейкінами -4, -10, -13 підвищують утворення sTNFRII і гальмують синтез TNF в активованих імунних клітинах. У нормі TGF β 1 – важливий інгібітор росту клітин епітеліального, гемопоетичного походження і супресор імунної відповіді. В заавансованих стадіях НГЛ визначається підвищена кількість TGF β 1, причому пухлинне мікрооточення є сприятливою мішенню для онкогенної дії TGF β 1 [4]. Цей фактор стимулював ангиогенез, супресію імунних клітин, ріст фібробластів і стромы [3]. У проведеному дослідженні ми, як і більшість авторів, засвідчили підвищену концентрацію TGF β 1 у плазмі крові хворих на НГЛ порівняно з контрольною групою. Підвищена концентрація TGF β 1 у крові при НГЛ супроводжується зниженою продукцією у КЖС МНПК і МНС при НГЛ активної, а не латентної форми TGF β 1, здатної викликати рістінгібіторні ефекти у біологічних тестах [4]. Концентрація TGF β 1 у КЖС МНС при НГЛ була майже вдвічі нижчою, ніж при РС. Ці результати можуть вказувати на те, що тканина селезінки при різних патологічних станах може бути важливим джерелом постачання фактора у кров, і зниження продукції TGF β 1 тканиною селезінки при НГЛ може сприяти втраті контролю над проліферацією неопластичних лімфоцитів [8]. Поряд з цим концентрація TGF β 1 у КЖС МНЛВ при НГЛ була вища, ніж в КЖС МНС і МНПК, що може бути причиною супресії імунної відповіді у ЛВ при НГЛ [5]. Нами виявлена негативна кореляція між показниками Щ НК периферичної крові і рівнем TNF та TGF β 1 у КЖС МНПК, які можуть впливати на подальшу активність НК перед міграцією у ЛВ і інші органи. У нашому дослідженні найвища активність НК проти галогенних лейкоцитних клітин визначена у тканині селезінки при НГЛ, в той час як показники Щ НК у периферичній крові і ЛВ були вірогідно нижчими, ніж в тканині селезінки. Цілком ймовірно, що НК, перебуваючи у периферичній крові з порушеним вмістом TNF і TGF β 1, не здатні звільнювати перфорин і гранзим В за наявності патологічних антигенів, або зазнавати апоптозу перед міграцією до вогнища пухлини [3, 5]. Поряд з цим наявність високої цитотоксичної активності НК у селезінці при НГЛ може бути причиною автоімунних ускладнень при даній патології і свідчити про існування додаткових факторів, відмінних за складом чи концентрацією, ніж у ЛВ чи периферичній крові. Показано, що при фолікулярних лімфомах НК, що інфільтрують пухлину, експонували зміненій з CD56⁺ на CD57⁺ маркер активації, який репрограмував поведінку асоційованих макрофагів (CD68⁺) і корелював з поширенням і ростом пухлини через паракринну секрецію ростових факторів для клітин НГЛ [5]. Отримані результати засвідчили, що рівень TNF у ЛВ був нижчим, ніж у тканині селезінки і корелював із нижчою активністю НК

проти галогенних клітин K562. За таких обставин ЛВ навряд чи могли здійснювати ефективний контроль за пухлинними клітинами, що поширювалися в організмі.

Висновки

1. У хворих на НГЛ концентрація як TNF, так і TGF β 1 у плазмі крові підвищена. В той же час МНПК і МНС хворих на НГЛ демонструють підвищення продукції TNF та зниження – TGF β 1.

2. Цитотоксична активність NK периферичної крові і лімфатичних вузлів при НГЛ знижена, тоді як NK селезінки – підвищена.

3. Отримані свідчення можливої ролі порушень локальної секреції TNF та TGF β 1 МНПК, МНЛВ, МНС в регуляції імунної відповіді при НГЛ з ураженням селезінки, зокрема, цитотоксичної активності NK.

Література

1. Продукція інтерлейкіну-2 і активована ним цитотоксичність мононуклеарних клітин хворих із злжкісними лімфомами / В.Л. Матлан, В.А. Барілка, С.В. Новак [та ін.] // Онкологія. – 2002. – 4, № 1. – С. 25–29.

2. Цитокиновый профиль больных лимфомами как дополнительный фактор прогноза / Т.И. Поспелова, Н.В. Скворцова, И.Б. Ковынев [и др.] // Гематол. и трансфузиол. – 2008. – 53, № 3. – С. 10–14.

3. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients / A. Bose, T. Chakraborty, K. Chakraborty [et al.] // Cancer Immunity. – 2008. – 8. – P. 10–19.

4. Heterogenous response of B lymphocytes to transforming growth factor-beta in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: correlation with the expression of TGF-beta receptors / L. Lagneaux, A. Delforge, D. Bron [et al.] // Br J Haematol. – 1997. – 97, 3. – P. 612–620.

5. Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia / E. Lion, Y. Willems, Z.N. Berneman [et al.] // Leukemia. – 2012. – 26. – P. 2019–2026.

6. Responses mediated downregulation of B cell a molecular mechanism for TNF- α / R.B. BlombergAlter-Wolf, B.B. Blomberg Alter-Wolf, M. Ratliff [et al.] // J Immunol. – 2012. – 188. – P. 279–286.

7. Sheegen K.C.F. Generation and characterization of hamster monoclonal antibodies that neutralize murine tumor necrosis factor / K.C.F. Sheegen, N.H. Ruddle, R.D. Schreiber // J Immunol. – 1989. – 142, 11. – P. 3884–3893.

8. The splenic microenvironment is a source of proangiogenesis/inflammatory mediators accelerating the expansion of murine erythroleukemic cells // Y. Shaked, D. Cervi, M. Neuman [et al.] // Blood. – 2005. – 105, 11. – P. 4500–4507.