

DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-1-45-52

УДК: [616.345+618.11]-006.6-003.2+616.155.32+577.2

Для цитирования: Юнусова Н.В., Стахеева М.Н., Афанасьев С.Г., Цыденова А.А., Фролова А.Е., Молчанов С.В., Коломиец Л.А., Чердынцева Н.В. Активность натуральных клеток-киллеров в биологических жидкостях у больных колоректальным раком и раком яичников. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (1): 45–52.

For citation: Yunusova N.V., Stakheyeva M.N., Afanasyev S.G., Tsydenova A.A., Frolova A.E., Molchanov S.V., Kolomiets L.A., Cherdyntseva N.V. Activity of natural killer cells in biological fluids from patients with colorectal and ovarian cancers. Siberian Journal of Oncology. 2017; 16 (1): 45–52.

## АКТИВНОСТЬ НАТУРАЛЬНЫХ КЛЕТОК-КИЛЛЕРОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ И РАКОМ ЯИЧНИКОВ

Н.В. Юнусова<sup>1,2</sup>, М.Н. Стахеева<sup>1</sup>, С.Г. Афанасьев<sup>1</sup>, А.А. Цыденова<sup>2</sup>,  
А.Е. Фролова<sup>1</sup>, С.В. Молчанов<sup>1</sup>, Л.А. Коломиец<sup>1,2</sup>, Н.В. Чердынцева<sup>1</sup>

Научно-исследовательский институт онкологии, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» Российской академии наук, г. Томск, Россия<sup>1</sup>

634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: bochkarevanv@oncology.tomsk.ru<sup>1</sup>

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Томск, Россия<sup>2</sup>  
634050, г. Томск, Московский тракт, 2<sup>2</sup>

### Аннотация

**Цель исследования** – сравнить показатели функциональной активности натуральных клеток-киллеров в зависимости от наличия злокачественного процесса и его распространенности. **Материал и методы.** В исследование были включены 10 больных раком яичников IIIС стадии, 5 больных с доброкачественными опухолями (ДО) яичника, 15 больных колоректальным раком T<sub>2-4</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> стадии. Контрольную группу составили 5 обследованных здоровых доноров. Для оценки количества и функциональной активности НК-клеток периферической крови и асцитической жидкости (АЖ) выполнена многоцветная проточная цитометрия на цитофлуориметре FACS Canto II. **Результаты.** Наличие злокачественного новообразования сопровождалось статистически значимым снижением в периферической крови относительного количества активированных НК-клеток, секретирующих гранзим В (GB) (CD56+CD107a+GB+PF-), и увеличением доли дегранулированных НК-клеток (CD56+CD107a+GB-PF-) по сравнению с соответствующими показателями у здоровых лиц. При этом отличительной особенностью больных раком яичников были низкие показатели общего количества НК-клеток в периферической крови (p<0,05). Увеличение размера первичной опухоли у больных колоректальным раком приводило к возрастанию в периферической крови доли активированных НК-клеток, содержащих гранулы цитолитических ферментов гранзима В и перфорина (PF). Вместе с тем вовлечение лимфатических узлов в опухолевый процесс при колоректальном раке не оказывало влияния на содержание и активацию НК-клеток. Сравнительный анализ НК-популяции у больных с доброкачественными и злокачественными новообразованиями яичников выявил значимое преобладание CD56+ пула клеток в асцитической жидкости над содержанием в периферической крови. Отличительной чертой ДО являлся более высокий уровень CD56+CD107a+ активированных и CD56+CD107a+GB-PF- дегранулированных клеток в АЖ, что косвенно указывает на реализацию НК-клетками цитотоксической функции. Для рака яичников было характерно преобладание дегранулированной популяции в периферической крови. **Заключение.** Наличие и распространенность злокачественного процесса оказывают выраженное влияние на содержание и функциональную активность НК-клеток. Накопление свободной жидкости в брюшной полости как у больных с ДО, так и со злокачественными опухолями яичников сопровождается существенным снижением уровня НК-клеток в периферической крови и его увеличением в АЖ. Выявленные различия функциональной активности НК-клеток в свободной жидкости в брюшной полости и периферической крови у больных раком яичников и ДО требуют дальнейшего изучения с исследованием рецепторного статуса лимфоцитов и, возможно, цитокин-продуцирующей функции НК-клеток.

**Ключевые слова:** рак яичников, колоректальный рак, натуральные киллеры, функциональная активность, периферическая кровь, асцит.

В процессах злокачественного роста (инвазивный рост, лимфогенное метастазирование) важную роль отводят состоянию иммунной системы и особенно функциональной активности натуральных киллеров. Натуральные или естественные киллеры (natural killer cells, NK-клетки) представляют гетерогенную субпопуляцию лимфоцитов системы врожденного иммунитета. NK-клетки составляют около 15 % всех циркулирующих лимфоцитов, они также были найдены в печени, селезенке, перитонеальной жидкости [1, 2]. Многими клиническими и экспериментальными исследованиями показано, что важным условием высокой эффективности противоопухолевого лечения является адекватное состояние иммунной системы организма, в том числе и уровень функциональной активности NK [3–5].

Для реализации своих функций NK используют различные механизмы, однако важное значение придают контактному цитолизу, путем которого NK-клетки убивают чувствительные к лизису клетки мишени. Этот эффект реализуется с участием цитотоксических гранул, содержащих гранзимы, перфорин, гранулизин, катепсины и ассоциированные с лизосомами мембранные протеины LAMP, причем поверхностная экспрессия LAMP-1 (CD107a) в настоящее время является общепризнанным маркером дегранулирующих натуральных киллеров [6, 7]. Значение поверхностной и внутриклеточной экспрессии в биологии NK-клеток в настоящее время изучается. Показано, что снижение экспрессии LAMP-1 существенно замедляет движение литических гранул к синаптической щели, а также приводит к снижению концентрации в них перфорина, но не гранзима В. Снижение уровня перфорина в литических гранулах в комбинации с нарушением их движения в LAMP-1-дефицитных клеточных линиях приводит к невозможности секреции гранзима В и ингибированию NK-клеточной цитотоксичности [7].

Известно, что реализация цитотоксического действия клеток иммунной системы с опухолевыми клетками-мишенями реализуется локально – в местах опухолевого роста, что определяет прогностическую важность состояния местного иммунитета. Имеются сведения о значительных различиях в содержании NK, как и других клеточных популяций иммунной системы, в асцитической жидкости и в периферической крови у больных раком яичника. При этом прогностической ценностью обладает соотношение NK, находящихся в АЖ и в периферической крови [8]. При сравнении субпопуляций цитотоксических клеток в периферической крови и асците больных с эпителиальным раком яичника было показано, что субпопуляция NK клеток в периферической крови была значительно снижена (около 5 %) по сравнению с асцитом (11 %), причем в АЖ, по сравнению с кровью, доминировала популяция CD56<sup>bright</sup> NK. Кроме того, в АЖ выявлено значительно большее количество лимфоцитов,

экспрессирующих NKG2D рецептор по сравнению с периферической кровью [9]. У больных колоректальным раком II и III стадии содержание NK-клеток было значительно ниже, чем у здоровых доноров [10, 11]. В других исследованиях было выявлено повышение процента периферических NK-клеток у больных колоректальным раком по сравнению со здоровыми лицами [12]. В периферической крови у больных раком толстой кишки NK-клетки демонстрируют измененный фенотип и дефекты в способности активировать дегрануляцию и IFN $\gamma$ -продукцию [13].

Таким образом, хотя в литературе имеются данные об общем количестве NK-клеток в биологических жидкостях и клеточных субпопуляциях NK-клеток при злокачественных новообразованиях толстой кишки и яичников, однако данные о функциональной активности NK-клеток практически отсутствуют, что и определило цель настоящего исследования.

**Цель исследования** – сравнить показатели функциональной активности натуральных клеток-киллеров в зависимости от наличия злокачественного процесса и его распространенности.

#### Материал и методы

В исследование были включены 10 больных с серозным и эндометриоидным раком яичников с распространенностью опухолевого процесса T<sub>3</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>, по классификации FIGO (2009) – III стадия и 5 больных с доброкачественными опухолями яичника (серозные и эндометриоидные цистаденомы, ДО), у которых во время операции выявлялось наличие свободной жидкости в брюшной полости. Возраст больных раком яичника варьировался от 39 до 68 лет (средний возраст – 53,4 ± 3,5 года), больных с ДО – от 51 до 68 лет (средний возраст – 58,8 ± 2,8 года). Также клиническую группу составили 15 больных колоректальным раком (средний возраст – 58,8 ± 2,9 года), из них 6 мужчин и 9 женщин. У 9 больных распространенность процесса соответствовала T<sub>2-4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>, у 6 – T<sub>2-4</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0</sub>. Контрольную группу составили 5 здоровых доноров, средний возраст – 52,4 ± 4,5 года.

Забор клинического материала (периферическая кровь, асцитическая жидкость) проводился до начала какого-либо лечения в вакутейнеры с гепарином. Образцы АЖ были получены во время оперативного вмешательства (диагностическая лапароскопия, циторедуктивная операция) в объеме около 20 мл. Из образцов асцитической жидкости предварительно выделяли клеточную фракцию центрифугированием в течение 20 мин при 900 g, после чего удаляли эритроциты путем их лизирования. Клетки цельной крови и клетки, выделенные из асцита, инкубировали со следующими антителами: CD45, CD56, CD107a (LAMP-1), антителами к перфорину (PF) и гранзиму В (GB) (BD, США), при этом учитывалась концентрация

Таблица 1

**Содержание NK-клеток и их субпопуляций в периферической крови у здоровых доноров, больных колоректальным раком и раком яичников, Me (25–75 %)**

Клеточная популяция	Контроль	Рак яичников	Колоректальный рак
CD45+CD56+	12,3 (8,1–14,5)	5,7 (2,9–6,7)*	10,10 (7,9–13,4)**
CD56+CD107a+	0,13 (0,1–0,5)	2,75 (0,5–7,7)*	0,65 (0,5–1,1)
CD107a+GB+PF–	15,57 (6,3–31,15)	3,28 (0,4–16,4)*	3,49 (0,2–18,2)*
CD107a+GB+PF+	22,65 (0,9–49,37)	32,32 (1,1–43,4)	13,43 (0,8–50)
CD107a+GB–PF–	47,95 (7,8–87,2)	59,24 (53,2–91,7)*	78,51 (61,4–92,3)*
CD107a+GB–PF+	6,62 (0,4–8,6)	5,14 (0,5–25)	4,58 (0,4–20)

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с показателями контрольной группы ( $p < 0,05$ ); \*\* – различия статистически значимы по сравнению с показателями у больных раком яичников ( $p < 0,05$ ); GB – гранзим В; PF – перфорин.

Таблица 2

**Содержание NK-клеток и их субпопуляций у больных колоректальным раком в зависимости от местной распространенности опухоли и наличия лимфогенного метастазирования, Me (25–75 %)**

Клеточная популяция	T <sub>2</sub>	T <sub>3-4</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>
CD45+CD56+	9,1 (8,9–13,4)	11,1 (7,9–12,9)	10,10 (8,9–13,4)	10,15 (7,1–14,15)
CD56+CD107a+	0,7 (0,63–0,72)	0,58 (0,5–1,3)	0,65 (0,5–0,7)	0,8 (0,35–1,25)
CD107a+GB+PF–	6,98 (2,7–19,1)	0 (0–0)*	5,81 (0,7–18,2)	2,8 (0–7,0)
CD107a+GB+PF+	6,14 (0,8–18,2)	20,72 (8,4–41,9)*	6,25 (3,5–18,2)	14,3 (4,1–39,3)
CD107a+GB–PF–	87,5 (66,7–93,1)	75,4 (71,4–80,3)	77,5 (66,7–87,5)	85,7 (60,7–97,1)
CD107a+GB–PF+	5,16 (1,5–16,7)	4,7 (0,7–20,4)	4,5 (0,3–11,7)	2,9 (0–7,6)

Примечание: \* – различия между группами статистически значимы ( $p < 0,05$ ); GB – гранзим В; PF – перфорин.

клеток в клеточной суспензии, полученной из АЖ [14]. Инкубация с двумя последними антителами проводилась после фиксации и пермеабиллизации клеток при помощи набора Cytofix/Cytoperm kit (BD, США) (стандартный протокол). Для оценки количества и функциональной активности NK-клеток периферической крови и АЖ выполнена многоцветная проточная цитометрия на цитофлуориметре FACS Canto II.

Статистическую обработку проводили с применением пакета программ Statistica 8.0. В таблицах результаты представлены как медиана с интерквартильным размахом – 25-й и 75-й процентиля, Me (25–75 %). Значимость различий оценивали с помощью критерия Манна – Уитни и Краскал – Уоллиса.

**Результаты**

Сравнительная характеристика содержания NK-клеток и их функционального статуса в контрольной группе у больных раком яичника и колоректальным раком представлена в табл. 1. Содержание NK-клеток в периферической крови у здоровых доноров и больных колоректальным раком не различалось, в то время как в периферической крови при раке яичников оно существенно снижено. Менее 1 % от всей популяции натуральных киллеров в периферической крови были активированы – имели поверхностную экспрессию CD56+CD107a+ у здоровых доноров и у больных колоректальным раком, в то время как при раке яичников эта популяция была существенно выше. Субпопуляционный состав активирован-

ных NK-клеток у здоровых доноров существенно отличался от больных злокачественными новообразованиями. У здоровых чаще выявлялась популяция CD107a+GB+PF- и реже субпопуляция CD107a+GB-PF-.

Сравнительная характеристика содержания NK-клеток и их субпопуляций у больных колоректальным раком в зависимости от размера опухоли и наличия лимфогенного метастазирования представлена в табл. 2. Анализ содержания NK-клеток и их субпопуляций в периферической крови у больных колоректальным раком показал, что при инвазивном росте NK-клетки у больных претерпевают функциональные изменения с уменьшением доли CD107a+GB+PF- и увеличением доли CD107a+GB+PF+ NK-клеток. При диссеминации опухолевых клеток по лимфатическим путям изменения количества и субпопуляций NK-клеток не происходит. Сравнительная характеристика содержания NK-клеток и их субпопуляций в выявляемой свободной жидкости в брюшной полости и периферической крови у больных с ДО и раком яичника представлена в табл. 3 и на рис. 1.

Как у больных с ДО, так и у больных с диссеминированными формами рака яичника количество NK-клеток и количество активированных киллеров в свободной жидкости в брюшной полости было существенно выше по сравнению с их количеством в периферической крови. Однако доля активированных киллеров в свободной жидкости в брюшной полости у больных с ДО был значительно выше, чем в асците, по сравнению с диссеминированными формами рака яичников. При ДО в

Таблица 3

Содержания НК-клеток и их субпопуляций в асцитической жидкости и периферической крови у больных с новообразованиями яичников, Me (25–75 %)

Клеточная популяция	Биологический субстрат	Доброкачественные опухоли	Рак яичников
CD45+CD56+	АЖ	33,6 (26,85–55,85)#	21,8 (7,2–57,1)#
	Кровь	3,1 (0,8–9,7)	5,7 (2,9–6,7)
CD56+CD107a+	АЖ	71,5 (64,0–85,3)*#	25,0(24,2–36,4)
	Кровь	1,22 (0,8–5,6)	2,75 (0,5–7,7)
CD107a+GB+PF–	АЖ	15,57 (1,32–56,4)#	33,62 (28,4–52,2)#
	Кровь	42,4 (39,1–,47,5)*	2,73 (0,7–16,4)
CD107a+GB+PF+	АЖ	36,75 (18,6–61,4)*	2,1 (0,2–13,6)
	Кровь	44,8 (39,3–,6)*	5,8 (0,4–42,7)
CD107a+GB–PF–	АЖ	47,5 (23,1–60,8)#	38,5 (12,3–58,3)#
	Кровь	0,62 (0,11–1,30)*	85,6 (54,7–95,8)
CD107a+GB–PF+	АЖ	0,125 (0,07–0,55)*	11,82 (2,50–28,4)
	Кровь	2,10 (0,40–3,81)	4,28 (0,6–25)

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с показателями у больных раком яичников (p<0,05); # – различия статистически значимы по сравнению с показателями в периферической крови (p<0,05); GB – гранзим В; PF – перфорин.

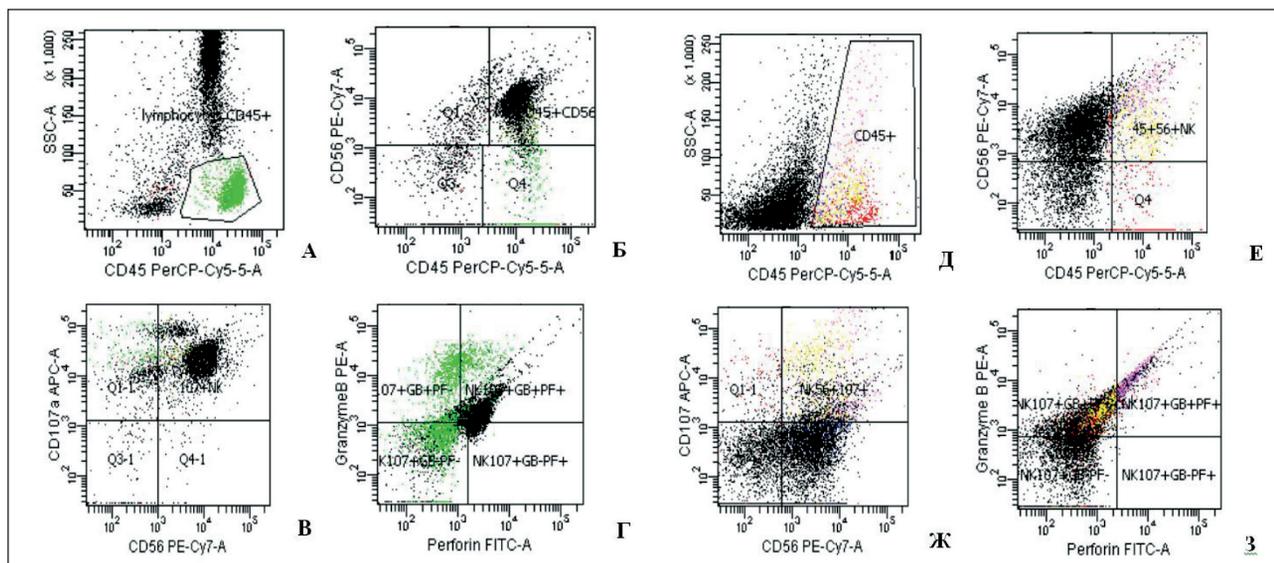


Рис. 1. Сравнение популяций НК-клеток в периферической крови и асцитической жидкости у больных РЯ, полученных при гей-тировании данных проточной цитофлуориметрии. Примечание: А, Д – популяция CD45+лейкоцитов в периферической крови и асците соответственно; Б, Е – популяция CD45+56+NK-клеток; В, Ж – популяция CD56+107+активированных НК-клеток; Г, Е – популяции CD56+107+активированных НК-клеток, продуцирующих перфорин (PF) и гранзим В (GB)

периферической крови и в свободной жидкости в брюшной полости доминировала субпопуляция активированных киллеров, содержащая полный набор ферментов в литических гранулах, в то время как у больных раком яичников в периферической крови абсолютно доминировала CD107+GB-PF- популяция (85,6 %), а в АЖ с равной частотой встречались CD107+GB+PF- и CD107+GB-PF- популяции (в 33 и 38 % случаев соответственно).

**Обсуждение**

Полученные нами результаты по количеству НК-клеток в периферической крови больных колоректальным раком и раком яичника согласуются с данными литературы и дополняют их. Количество НК-клеток существенно снижается в перифери-

ческой крови у больных с диссеминированными формами рака яичника [9]. Однако в отношении колоректального рака есть противоречивые данные как о снижении, так и о повышении количества НК-клеток периферической крови. В нашей работе существенных различий по сравнению со здоровыми донорами не выявлено. Важно также отметить, что хотя у больных раком яичников в периферической крови общее количество НК-клеток было снижено, однако процент активированных клеток, имеющих поверхностную экспрессию CD107a, был наивысшим среди всех групп.

Функциональная активность периферических НК-клеток у онкологических больных существенно изменена: снижен процент CD107a+GB+PF- клеток, а процент CD107a+GB-PF- НК повышен.

Популяцию CD107a+GB-PF-NK можно рассматривать и как пул функционально неполноценных клеток, не содержащих активных цитотоксических ферментов в литических гранулах, и как дегранулированные NK-клетки, поскольку, по данным A. Cohnen et al. (2013), поверхностно-экспрессирующийся CD107a защищает киллеры от апоптоза после дегрануляции [6].

Нами впервые показана связь функциональной активности NK-клеток периферической крови у больных колоректальным раком с инвазивным опухолевым ростом и лимфогенным метастазированием. При этом выявлена активация NK-клеток при увеличении размера опухоли с увеличением доли субпопуляций CD107a+GB+PF- и CD107a+GB+PF+NK-клеток. Несмотря на то, что лимфогенное метастазирование наряду с формированием гематогенных метастазов в печень является основной формой опухолевой прогрессии при раке толстой кишки, наличие или отсутствие лимфогенной диссеминации не оказало значимого влияния на количество и субпопуляционный состав NK-клеток.

Хотя количество NK-клеток в АЖ у больных раком яичника велико, мнения об их функциональной полноценности весьма противоречивы. В периферической крови и асците количество перфорин-позитивных и гранзим В-позитивных клеток у больных раком яичника существенно снижено. По данным S. Lukesova et al. (2013), в АЖ у больных раком яичника преобладает популяция CD56<sup>bright</sup> натуральных киллеров, обладающая слабой цитолитической активностью [9]. Считается, что популяции CD56<sup>bright</sup> и CD56<sup>dim</sup> отражают различные стадии дифференцировки и созревания лимфоцитов, CD56<sup>dim</sup> является более зрелой популяцией. Полагают, что в асцитической жидкости NK-клетки появляются из лимфатических узлов, вследствие их сдавления опухолевыми конгломератами и блокады оттока лимфы по лимфатическим путям. CD56<sup>bright</sup> составляют до 75 % всех NK-клеток в нормальных лимфатических узлах, они обладают слабой цитотоксичностью, но высокой цитокин-продуцирующей активностью, способны к контактному взаимодействию с дендритными клетками и играют важную роль в регуляции адаптивного иммунного ответа [14]. Еще в 2007 г. A. Vamias et al. показали существенную разницу в количестве и субпопуляционном составе (на основании сочетания поверхностных антигенов и рецепторов) лимфоцитов в периферической крови и АЖ у больных раком яичника с доминированием в асците субпопуляции Treg CD4+CD25+ и NKT-клеток с фенотипом CD3+CD56+ [8]. Выявлена ассоциация этих популяций с уровнем VEGF и TNF alpha в АЖ, а также ассоциация с химиорезистентностью к препаратам платины [16]. Эти данные подтверждены исследованиями различных субпопуляций цитотоксических клеток

в периферической крови и АЖ у больных раком яичников [9]. По нашим данным, уже у больных с ДО яичников, сопровождающимися накоплением свободной жидкости в брюшной полости, уровень NK-клеток в периферической крови существенно снижается, а в свободной жидкости увеличивается. Аналогичная тенденция выявлена и у больных раком яичников. Однако доля активированных, дегранулирующих NK-клеток в свободной жидкости в брюшной полости существенно выше у больных с ДО по сравнению с больными раком яичника. Выявленные различия функциональной активности NK-клеток в свободной жидкости в брюшной полости и периферической крови у больных раком яичников и ДО требуют дальнейшего изучения с исследованием рецепторного статуса лимфоцитов и, возможно, цитокин-продуцирующей функции NK-клеток.

В связи с постоянным накоплением данных о состоянии системы местного иммунитета у больных раком яичника, с развитием интраперитонеальной химиотерапии и интраперитонеальной иммунотерапии рака яичников [17], безусловно, представляются актуальными исследования по изучению субпопуляционного состава и функциональной активности NK-клеток с изучением возможных путей регуляции экспрессии рецепторов NK-клеток и их важнейших внутриклеточных компонентов.

### Заключение

Наличие и распространенность злокачественного процесса оказывают выраженное влияние на содержание и функциональную активность NK-клеток. Увеличение размера первичной опухоли у больных колоректальным раком приводило к возрастанию в периферической крови доли активированных NK-клеток, содержащих гранулы цитолитических ферментов гранзима В и перфорина. Вместе с тем вовлечение лимфатических узлов в опухолевый процесс при колоректальном раке не оказывало влияния на содержание и активацию NK-клеток. Накопление свободной жидкости в брюшной полости как у больных с доброкачественными, так и у больных со злокачественными опухолями яичников сопровождается существенным снижением уровня NK-клеток в периферической крови и его увеличением в свободной жидкости и асците. Выявленные различия функциональной активности NK-клеток в свободной жидкости в брюшной полости и периферической крови у больных раком яичников и ДО требуют дальнейшего изучения с исследованием рецепторного статуса лимфоцитов и, возможно, цитокин-продуцирующей функции NK-клеток.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (номер гранта 17-04-00207а).*

ЛИТЕРАТУРА

1. Baginska J., Viry E., Paggetti J., Medves S., Berchem G., Moussay E., Janji B. The Critical Role of the Tumor Microenvironment in Shaping Natural Killer Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity. *Front Immunol.* 2013 Dec 25; 4: 490. doi: 10.3389/fimmu.2013.00490.
2. Larsen S.K., Gao Y., and Basse P.H. NK Cells in the Tumor Microenvironment. *Crit Rev Oncog.* 2014; 19 (1–2): 91–105.
3. Apetoh L., Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Piacentini M., Kroemer G., Zitvogel L. Immunogenic chemotherapy: discovery of a critical protein through proteomic analyses of tumor cells *Cancer Genomics Proteomics.* 2007 Mar-Apr; 4 (2): 65–70.
4. Hannani D., Sistigu A., Kepp O., Galuzzi L., Kroemer G., Zitvogel L. Prerequisites for the antitumor vaccine-like effect of chemotherapy and radiotherapy. *Cancer J.* 2011; 17 (5): 351–8. doi: 10.1097/PP0.0b013e3182325d4d.
5. Стахеева М.Н., Чойзионов Е.Л., Чижевская С.Ю., Бычков В.А. Взаимосвязь эффективности противоопухолевого лечения с состоянием иммунной системы у больных раком гортани и гортаноглотки. *Медицинская иммунология.* 2013; 15 (6): 553–62.
6. Cohnen A., Chiang S.C., Stojanovic A., Schmidt H., Claus M., Saftig P., Janßen O., Cerwenka A., Bryceson Y.T., Watzl C. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood.* 2013 Aug 22; 122 (8): 1411–8. doi: 10.1182/blood-2012-07-441832.
7. Krzewski K., Gil-Krzewska A., Nguyen V., Peruzzi G., Coligan J.E. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood.* 2013 Jun 6; 121(23): 4672–83. doi: 10.1182/blood-2012-08-453738.
8. Bamias A., Tsiatas M.L., Kafantari E., Liakou C., Rodolakis A., Voulgaris Z., Vlahos G., Papageorgiou T., Tsiatsilonis O., Bamia C., Papatheodoridis G., Politi E., Archimandritis A., Antsaklis A., Dimopoulos M.A. Significant differences of lymphocytes isolated from ascites of patients with ovarian cancer compared to blood and tumor lymphocytes. Association of CD3+CD56+ cells with platinum resistance. *Gynecol Oncol.* 2007 Jul; 106 (1): 75–81. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.02.029.
9. Lukesova S., Vroblova V., Tosner J., Kopecky J., Sedlakova I., Čermáková E., Vokurkova D., Kopecky O. Comparative study of various subpopulations of cytotoxic cells in blood and ascites from patients with ovarian carcinoma. *Contemp. Oncol. (Pozn).* 2015; 19 (4): 290–9. doi: 10.5114/wo.2015.54388.
10. Bai D., Yang G., Yuan H., Li Y., Wang K., Shao H. Perioperative cimetidine application modulates natural killer cells in patients with colorectal cancer: a randomized clinical study. *J. Tongji Med. Univ.* 1999; 19 (4): 300–303.
11. Peng Y.P., Zhu Y., Zhang J.J., Xu Z.K., Qian Z.Y., Dai C.C., Jiang K.R., Wu J.L., Gao W.T., Li Q., Du Q., Miao Y. Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patient with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. *J Transl Med.* 2013 Oct 20; 11: 262. doi: 10.1186/1479-5876-11-262.
12. Kim J.C., Choi J., Lee S.J., Lee Y.A., Jeon Y.M., Kang Y.W., Lee J.K. Evaluation of cytolytic activity and phenotypic changes of circulating blood immune cells in patients with colorectal cancer by a simple preparation of peripheral blood mononuclear cells. *J Korean Surg Soc.* 2013 Nov; 85 (5): 230–5. doi: 10.4174/jkss.2013.85.5.230.
13. Rocca Y.S., Roberti M.P., Arriaga J.M., Amat M., Bruno L., Pampena M.B., Huertas E., Loria F.S., Pairola A., Bianchini M., Mordoh J., Levy E.M. Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients. *Innate Immun.* 2013 Feb; 19 (1): 76–85. doi: 10.1177/1753425912453187.
14. Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И. Основные свойства и функции NK-клеток человека. *Иммунология.* 2012; 33 (4): 220–4.
15. Cornfield D.B., Gheith S.M. Flow cytometric quantitation of natural killer cells and T lymphocytes expressing T-cell receptors alpha/beta and gamma/delta is not helpful in distinguishing benign from malignant body cavity effusions. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009 May; 76 (3): 213–7. doi: 10.1002/cyto.b.20455.
16. Bamias A., Koutsoukou V., Terpos E., Tsiatas M.L., Liakos C., Tsiatsilonis O., Rodolakis A., Voulgaris Z., Vlahos G., Papageorgiou T., Papatheodoridis G., Archimandritis A., Antsaklis A., Dimopoulos M.A. Correlation of NK T-like CD3+CD56+ cells and CD4+CD25+(hi) regulatory T cells with VEGF and TNFalpha in ascites from advanced ovarian cancer: Association with platinum resistance and prognosis in patients receiving first-line, platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol.* 2008; 108 (2): 421–7. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.10.018.
17. Fossati M., Buzzonetti A., Monego G., Catzola V., Scambia G., Fattorossi A., Battaglia A. Immunological changes in the ascites of cancer patients after intraperitoneal administration of the bispecific antibody catumaxomab (anti-EpCAM×anti-CD3). *Gynecol Oncol.* 2015 Aug; 138 (2): 343–51. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.06.003.

Поступила 8.09.16

Принята в печать 30.10.16

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Юнусова Наталья Валерьевна**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: bochkarevanv@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 3513-1888.

**Стахеева Марина Николаевна**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: StakheyevaM@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 7804-0361.

**Афанасьев Сергей Геннадьевич**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник торако-абдоминального отделения, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: AfanasievSG@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 9206-3037.

**Цыденова Анастасия Александровна**, студентка 6-го курса лечебного факультета, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Россия). E-mail: nastya.stasy@mail.ru.

**Молчанов Сергей Валериевич**, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения гинекологии с группой профилактики, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: SergeyMolchanov1980@gmail.com. SPIN-код: 2719-3289.

**Коломиец Лариса Александровна**, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующая отделением гинекологии с группой профилактики, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: kolomietsla@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 6316-1146.

**Чердынцева Надежда Викторовна**, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: nvch@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 5344-0990.

## ACTIVITY OF NATURAL KILLER CELLS IN BIOLOGICAL FLUIDS FROM PATIENTS WITH COLORECTAL AND OVARIAN CANCERS

N.V. Yunusova<sup>1,2</sup>, M.N. Stakheyeva<sup>1</sup>, S.G. Afanasyev<sup>1</sup>, A.A. Tsydenova<sup>2</sup>,  
A.E. Frolova<sup>1</sup>, S.V. Molchanov<sup>1</sup>, L.A. Kolomiets<sup>1,2</sup>, N.V. Cherdyntseva<sup>1</sup>

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Russia, Tomsk<sup>1</sup>

5, Kooperatyvny street, 634009-Tomsk, Russia. E-mail: bochkarevanv@oncology.tomsk.ru<sup>1</sup>

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk<sup>2</sup>

2, Moskovskiy Tract, 634050-Tomsk, Russia<sup>2</sup>

### Abstract

**Objective.** To compare the functional activity of natural killer cells in peripheral blood and ascites from patients with different stages of colorectal and ovarian cancers and benign ovarian tumors. **Material and methods.** The study included 10 patients with stage IIIC ovarian cancer (FIGO, 2009), 5 patients with benign ovarian tumors (BOTs), and 15 patients with colorectal cancer (T<sub>2-4</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub>). The control group consisted of 5 healthy donors. To evaluate the number and functional activity of NK-cells in peripheral blood and ascites, the FACS Canto II Flow Cytometer was used. **Results.** In peripheral blood of patients with ovarian and colorectal cancers, the relative number of activated NK-cells capable of secreting granzyme B (GB) (CD56 + CD107a + GB + PF-) was significantly lower and the proportion of degranulated NK-cells (CD56 + CD107a + GB- PF-) was higher than those of healthy donors. Low total NK-cell counts in peripheral blood were a distinctive feature of ovarian cancer patients (p<0.05). The proportion of activated peripheral blood NK-cells, containing granules of cytolytic enzymes GB and perforin (PF) increased with tumor growth. However, lymph node metastasis in patients with colorectal cancer did not affect the level and activation of NK-cells. The comparative analysis of NK-populations in patients with benign and malignant ovarian tumors revealed that the level of CD56 + cells was significantly higher in tumor ascites compared to peripheral blood. In patients with BTs, the levels of CD56 + CD107a + and activated CD56 + CD107a + GB-PF-degranulated cells was higher in ascites than in blood. In patients with ovarian cancer, the level of degranulated cells was higher in peripheral blood than in malignant ascites. **Conclusion.** The tumor cells and tumor microenvironment were found to affect the number and the functional activity of NK-cells. The accumulation of free fluid within the peritoneal cavity in patients with both benign and malignant ovarian tumors resulted in significantly decreased levels of NK-cells in peripheral blood and increased levels in ascites. The differences in the functional activity of NK-cells in ascites and peripheral blood of patients with ovarian cancer require further investigation of the lymphocyte receptor status and possibly cytokine-producing function of NK-cells.

**Key words:** ovarian cancer, colorectal cancer, natural killer cells, functional activity of peripheral blood, ascites.

### REFERENCES

1. Baginska J., Viry E., Paggetti J., Medves S., Berchem G., Moussay E., Janji B. The Critical Role of the Tumor Microenvironment in Shaping Natural Killer Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity. *Front Immunol.* 2013 Dec 25; 4: 490. doi: 10.3389/fimmu.2013.00490.
2. Larsen S.K., Gao Y., and Basse P.H. NK Cells in the Tumor Microenvironment. *Crit Rev Oncog.* 2014; 19 (1-2): 91-105.
3. Apetoh L., Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Piacentini M., Kroemer G., Zitvogel L. Immunogenic chemotherapy: discovery of a critical protein through proteomic analyses of tumor cells. *Cancer Genomics Proteomics.* 2007 Mar-Apr; 4 (2): 65-70.
4. Hannani D., Sistigu A., Kepp O., Galuzzi L., Kroemer G., Zitvogel L. Prerequisites for the antitumor vaccine-like effect of chemotherapy and radiotherapy. *Cancer J.* 2011; 17 (5): 351-8. doi: 10.1097/PPO.0b013e3182325d4d.
5. Staheeva M.N., Chojnzonov E.L., Chizhevskaja S.Yu., Bychkov V.A. Interrelationship between efficiency of cancer treatment and state of immune system in patients with laryngeal and hypopharyngeal cancer. *Medical immunology.* 2013; 15 (6): 553-62. [in Russian]
6. Cohnen A., Chiang S.C., Stojanovic A., Schmidt H., Claus M., Saftig P., Janßen O., Cerwenka A., Bryceson Y.T., Watzl C. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood.* 2013 Aug 22; 122 (8): 1411-8. doi: 10.1182/blood-2012-07-441832.
7. Krzewski K., Gil-Krzewska A., Nguyen V., Peruzzi G., Coligan J.E. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood.* 2013 Jun 6; 121 (23): 4672-83. doi: 10.1182/blood-2012-08-453738.
8. Bamias A., Tsiatas M.L., Kafantari E., Liakou C., Rodolakis A., Voulgaris Z., Vlahos G., Papageorgiou T., Tsitsilonis O., Bamia C., Papatheodoridis G., Politi E., Archimandritis A., Antsaklis A., Dimopoulos M.A. Significant differences of lymphocytes isolated from ascites of patients with ovarian cancer compared to blood and tumor lymphocytes. Association of CD3+CD56+ cells with platinum resistance. *Gynecol Oncol.* 2007 Jul; 106 (1): 75-81. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.02.029.
9. Lukesova S., Vroblova V., Tosner J., Kopecky J., Sedlakova L., Čermáková E., Vokurkova D., Kopecky O. Comparative study of various subpopulations of cytotoxic cells in blood and ascites from patients with ovarian carcinoma. *Contemp. Oncol. (Pozn).* 2015; 19 (4): 290-9. doi: 10.5114/wo.2015.54388.
10. Bai D., Yang G., Yuan H., Li Y., Wang K., Shao H. Perioperative cimetidine application modulates natural killer cells in patients with colorectal cancer: a randomized clinical study. *J. Tongji Med. Univ.* 1999; 19 (4): 300-303.
11. Peng Y.P., Zhu Y., Zhang J.J., Xu Z.K., Qian Z.Y., Dai C.C., Jiang K.R., Wu J.L., Gao W.T., Li Q., Du Q., Miao Y. Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patient with pancreatic cancer, gastric

cancer, and colorectal cancer. *J Transl Med.* 2013 Oct 20; 11: 262. doi: 10.1186/1479-5876-11-262.

12. Kim J.C., Choi J., Lee S.J., Lee Y.A., Jeon Y.M., Kang Y.W., Lee J.K. Evaluation of cytolytic activity and phenotypic changes of circulating blood immune cells in patients with colorectal cancer by a simple preparation of peripheral blood mononuclear cells. *J Korean Surg Soc.* 2013 Nov; 85 (5): 230–5. doi: 10.4174/jkss.2013.85.5.230.

13. Rocca Y.S., Roberti M.P., Arriaga J.M., Amat M., Bruno L., Pamperna M.B., Huertas E., Loria F.S., Pairola A., Bianchini M., Mordoh J., Levy E.M. Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients. *Innate Immun.* 2013 Feb; 19 (1): 76–85. doi: 10.1177/1753425912453187.

14. Abacushina E.V., Kuzmina E.G., Kovalenko E.I. Basic properties and functions of the human NK-cells. *Immunology.* 2012; 33 (4): 220–4. [in Russian]

15. Cornfield D.B., Gheith S.M. Flow cytometric quantitation of natural killer cells and T lymphocytes expressing T-cell receptors alpha/beta and gamma/delta is not helpful in distinguishing benign from malignant body

cavity effusions. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009 May; 76 (3): 213–7. doi: 10.1002/cyto.b.20455.

16. Bamias A., Koutsoukou V., Terpos E., Tsiatas M.L., Liakos C., Tsiatsilonis O., Rodolakis A., Voulgaris Z., Vlahos G., Papageorgiou T., Papatheodoridis G., Archimandritis A., Antsaklis A., Dimopoulos M.A. Correlation of NK T-like CD3+CD56+ cells and CD4+CD25+(hi) regulatory T cells with VEGF and TNFalpha in ascites from advanced ovarian cancer: Association with platinum resistance and prognosis in patients receiving first-line, platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol.* 2008; 108 (2): 421–7. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.10.018.

17. Fossati M., Buzzonetti A., Monego G., Catzola V., Scambia G., Fattorossi A., Battaglia A. Immunological changes in the ascites of cancer patients after intraperitoneal administration of the bispecific antibody catumaxomab (anti-EpCAM×anti-CD3). *Gynecol Oncol.* 2015 Aug; 138 (2): 343–51. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.06.003.

Received 8.09.16  
Accepted 30.10.16

#### ABOUT THE AUTHORS

**Yunusova Natalia V.**, MD, DSc, Leading Researcher, Tumor Biochemistry Laboratory, Cancer Research Institute, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: bochkarevanv@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 3513-1888.

**Stakheyeva Marina N.**, MD, DSc, Senior Research Scientist, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: StakheyevaM@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 7804-0361.

**Afanasyev Sergey G.**, MD, DSc, Professor, Principal Investigator, Thoracic and Abdominal Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: AfanasievSG@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 9206-3037.

**Tsydenova Anastasia A.**, 6-nd-year student of Physician Faculty, Siberian State Medical University (Tomsk, Russia). E-mail: nastya.stasy@mail.ru.

**Molchanov Sergey V.**, MD, PhD, Researcher, Department of Gynecology with a group of prevention, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: SergeyMolchanov1980@gmail.com. SPIN-code: 2719-3289.

**Kolomiets Larisa A.**, MD, DSc, Professor, Head, Department of Gynecology with the Prevention Group, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: kolomietsla@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 6316-1146.

**Cherdyntseva Nadezhda V.**, DSc, Associate Member of Russian Academy of Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: nvch@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 5344-0990.