

А.О. Чеботарь, И.А. Семёник
**CD4- И CD8-ПОЗИТИВНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ
В ПЕРИТУМОРОЗНОЙ ЗОНЕ ГЛИАЛЬНОЙ ОПУХОЛИ КРЫС
В РАЗНЫЕ СРОКИ ЭКСПЕРИМЕНТА**

Научный руководитель: канд. мед. наук С.Н. Рябцева
*Лаборатория «Центр электронной и световой микроскопии»
Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск*

A.O. Chabatar, I.A. Siamionik
**CD4- AND CD8-POSITIVE CELLS IN THE PERITUMORAL ZONE
OF A GLIAL TUMOR IN RATS IN DIFFERENT TIME OF EXPERIMENT**

Tutor: PhD S.N. Rjabceva
*Laboratory "Center for Electron and Light Microscopy"
Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk*

Резюме. Изучен характер динамических изменений популяций CD4⁺- и CD8⁺-клеток в перитуморозной зоне глиальной опухоли после имплантации клеток линии глиомы С6 в головной мозг крыс в разные сроки эксперимента.

Ключевые слова: глиома, перитуморозное микроокружение, макрофаги, Т-лимфоциты.

Resume. The dynamic changes in the populations of CD4⁺- and CD8⁺-cells in the peritumorous zone of a glial tumor after implantation of C6 glioma cells into the brain of rats at different periods of the experiment was studied.

Keywords: glioma, peritumoral microenvironment, macrophages, T-lymphocytes.

Актуальность. Глиомы представляют собой гетерогенную группу первичных опухолей центральной нервной системы, которые происходят из глиальных клеток-предшественников [2], среди которых глиобластома является наиболее злокачественной и часто встречающейся опухолью головного мозга, на ее долю приходится порядка 60% всех опухолей данной локализации [3]. Несмотря на хирургическую резекцию, лучевую терапию и/или адьювантную химиотерапию пациенты с глиобластомой имеют низкую медиану выживаемости. Тем не менее, иммунная терапия показывает многообещающие результаты.

В перитуморозной зоне опухоли обнаруживаются различные типы иммунных клеток и цитокинов, среди которых выявляются CD8⁺- и CD4⁺-Т-лимфоциты, которые являются наиболее важными клетками для иммунной терапии. Так же, как и CD8⁺- и CD4⁺-макрофаги, которые связаны с «ускользанием» опухоли от иммунного ответа, с ангиогенезом и инвазией. Предыдущие исследования показали, что инфильтрация опухоли и перитуморозной зоны лимфоцитами и макрофагами является важным прогностическим фактором клинического исхода [4,5].

Изучение связи между опухолевыми клетками и иммунными клетками в перитуморозной зоне, включая как Т-лимфоциты, так и макрофаги имеет большой потенциал, учитывая их контакты с опухолевыми клетками, что может послужить потенциальной терапевтической мишенью для лечения глиальных опухолей.

Цель: изучить характер распространения CD4⁺- и CD8⁺-позитивных клеток в перитуморозной зоне глиальной опухоли после имплантации клеток линии глиомы С6 в головной мозг крыс в разные сроки эксперимента.

Задачи:

1. Оценить клеточную плотность лимфоцитов и макрофагов в перитуморозной зоне головного мозга подопытных животных по данным экспрессии маркера CD8 в разные сроки эксперимента.

2. Оценить клеточную плотность лимфоцитов и макрофагов в перитуморозной зоне головного мозга подопытных животных по данным экспрессии маркера CD4 в разные сроки эксперимента.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на крысах линии Wistar массой 230–270 г обоего пола. Манипуляции с животными в ходе экспериментов осуществляли с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных [1]. Протокол исследований одобрен комиссией по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларуси.

В ходе оперативного вмешательства, с помощью стереотаксического аппарата, по координатам атласа мозга крысы, животным проводилась имплантация опухолевых клеток. Точка мишени на черепе устанавливалась в правом полушарии на 2 мм выше и правее от брегмы (точки пересечения сагитального и венечного шва на черепе подопытного животного). Далее с помощью фрезы диаметром 2 мм в данной точке выполнялось фрезевое отверстие. Клеточная суспензия линии глиомы С6 в рабочем разведении $1,0 \cdot 10^6$ клеток/мл в объеме 10 мкл с помощью дозатора вводилась в головной мозг подопытных животных. Животные выводились из эксперимента на 7-е, 14-е, 21-е сутки с последующей оценкой перитуморозной зоны. Были сформированы 3 группы исследования в соответствии со сроком выведения животных из эксперимента (n=5 в каждой экспериментальной группе).

Для оценки плотности клеток в перитуморозной зоне головного мозга подопытных животных проводилось иммуногистохимическое исследование с маркерами CD4 (E-AB-22098, Elabscience, в рабочем разведении 1:400) и CD8 (E-AB-65944, Elabscience, в рабочем разведении 1:300). После иммуногистохимического исследования срезы сканировали на гистологическом сканере AperioT2 фирмы Leica при увеличении $\times 20,0$.

Для подсчета клеток микроглии в приложении SlideViwer, с помощью функции «Take Snapshot», делали микрофотографии на увеличении $\times 40,0$ в 10-ти неперекрывающихся полях зрения. Подсчёт клеток проводился с использованием программы Image J (США) и ее приложения «Multi-point». В подсчет не включали клетки, тела которых частично или полностью находились за рамками поля зрения, а также позитивные к маркерам клетки, находящиеся в сосудах. Площадь анализируемого поля составила 122580,894 мкм².

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Использовался непараметрический метод

U-критерия теста Манна–Уитни ($p < 0,05$). Данные описательной статистики указаны в виде медианы (Me) и квартилей (Q25%; Q75%).

Результаты и их обсуждение. Во всех исследованных образцах головного мозга подопытных животных наблюдалась положительная реакция с исследуемыми первичными антителами. Выявленные позитивные клетки в перитуморозной зоне были разделены на положительные к маркерам лимфоциты и макрофаги.

Спустя семь суток от начала эксперимента в перитуморозной зоне глиомы С6 медиана клеточной плотности $CD4^+$ -лимфоцитов составила 40,8 (32,6;65,3) клеток/мкм². Плотность $CD4^+$ -макрофагов в перитуморозной зоне была 65,3 (16,3;130,5) клеток/мкм². При этом 27,9% позитивных клеток располагались в периваскулярной области. Достоверных различий по количеству $CD4^+$ -лимфоцитов и макрофагов в перитуморозной зоне глиомы С6 на 7 сутки эксперимента не установлено ($p > 0,05$).

$CD8^+$ -макрофаги на седьмые сутки от имплантации опухолевых клеток определялись в единичных полях зрения, медиана их клеточной плотности в перитуморозной зоне составила 0,0 (0,0;0,0) клеток/мкм², при этом $CD8^+$ -лимфоцитов в анализируемых полях зрения не выявлено. Достоверных различий по количеству $CD8^+$ -лимфоцитов и макрофагов в перитуморозной зоне глиомы С6 на 7 сутки эксперимента не установлено ($p > 0,05$).

При сравнении полученных данных по клеточной плотности $CD4/CD8$ -позитивных клеток было установлено достоверное преобладание $CD4$ -положительных лимфоцитов и макрофагов над $CD8^+$ -клетками в перитуморозной зоне глиальной опухоли на седьмые сутки от начала проведения эксперимента ($p < 0,001$ для двух типов клеток).

На 14-е сутки эксперимента плотность $CD4^+$ -лимфоцитов в перитуморозной зоне составила 24,47 (8,2;48,9) клеток/мкм². Плотность $CD4^+$ -макрофагов в перитуморозной зоне составила 89,7 (44,8;126,4) клеток/мкм². При этом 60,8% от всех $CD4^+$ -клеток на 14-е сутки эксперимента располагались периваскулярно. Было установлено достоверное преобладание клеточной плотности $CD4^+$ -макрофагов над $CD4^+$ -лимфоцитами в перитуморозной зоне глиальной опухоли ($p < 0,01$). Статистически значимых различий между клеточной плотностью $CD4^+$ -лимфоцитов и $CD4^+$ -макрофагов на 14-е сутки при сравнении с седьмыми не установлено ($p > 0,05$).

Спустя две недели в перитуморозной зоне медиана плотности $CD8^+$ -лимфоцитов составила 8,2 (0,0;57,1) клеток/мкм². Плотность $CD8^+$ -макрофагов была равна 40,8 (8,2;73,4) клеток/мкм². При этом незначительное количество $CD8^+$ -клеток (13%) перитуморозной зоны были сконцентрированы в периваскулярной области. Установлено достоверное преобладание плотности $CD8^+$ -макрофагов над $CD8^+$ -лимфоцитами ($p < 0,05$). Также отмечено увеличение клеточной плотности $CD8^+$ -лимфоцитов ($p < 0,01$) и $CD8^+$ -макрофагов ($p < 0,01$) от седьмых к 14-м суткам эксперимента.

В перитуморозной зоне глиальной опухоли на 14-е сутки эксперимента было выявлено достоверное преобладание $CD4^+$ -лимфоцитов над субпопуляцией $CD8^+$ -

лимфоцитов ($p < 0,001$). Также было установлено преобладание $CD4^+$ -макрофагов над $CD8^+$ -макрофагами перитуморозной зоны глиальной опухоли ($p < 0,01$).

На 21-е сутки эксперимента плотность $CD4^+$ -клеток в перитуморозной зоне была следующая: $CD4^+$ -лимфоцитов – 16,3 (0,0;16,3) клеток/ $\mu\text{м}^2$, $CD4^+$ -макрофагов – 16,3 (8,2;24,5) клеток/ $\mu\text{м}^2$. В периваскулярном пространстве отмечены единичные $CD4^+$ -клетки. Достоверных различий по клеточной плотности $CD4^+$ -клеток разных популяций не выявлено ($p > 0,05$). При сравнении со значениями клеточной плотности данных популяций клеток к 14-м суткам установлено значимое снижение плотности $CD4^+$ -лимфоцитов ($p < 0,05$) и $CD4^+$ -макрофагов ($p < 0,001$) к 21-м суткам эксперимента.

На 21-е сутки в перитуморозной зоне выявлялись многочисленные $CD8^+$ -макрофаги, медиана их клеточной плотности была равна 167,2 (73,4;212,1) клеток/ $\mu\text{м}^2$, $CD8^+$ -лимфоцитов – 4,1 (0,0;8,2) клеток/ $\mu\text{м}^2$. Вокруг сосудов локализовалось 10,6% клеток с положительной экспрессией маркера $CD8$. К 21-м суткам эксперимента установлены достоверные различия по клеточной плотности $CD8^+$ -лимфоцитов и макрофагов ($p < 0,001$) с преобладанием последних. При прогрессировании опухоли от 14-х к 21-м суткам отмечается увеличение плотности $CD8^+$ -макрофагов в перитуморозной зоне ($p < 0,001$). Различий по клеточной плотности $CD8^+$ -лимфоцитов при опухолевом росте к 21-м суткам эксперимента не установлено ($p > 0,05$).

При сравнении полученных данных по клеточной плотности $CD4^+$ - и $CD8^+$ -клеточных популяций на 21-е сутки эксперимента было установлено достоверное преобладание $CD8^+$ -макрофагов над $CD4^+$ -клетками в перитуморозной зоне глиальной опухоли ($p < 0,001$).

Таким образом, при прогрессировании опухолевого процесса наблюдаются динамические изменения иммунного микроокружения в перитуморозной зоне опухоли: на 7-е и 14-е сутки наблюдается преобладание клеточного пула $CD4^+$ -лимфоцитов над $CD8^+$ -лимфоцитами, $CD4^+$ -макрофагов над $CD8^+$ -макрофагами, которое в дальнейшем (на 21-е сутки) сменяется на преобладание $CD8^+$ -макрофагов над $CD4^+$ -макрофагами.

Роль $CD4^+$ - и $CD8^+$ -макрофагов при опухолевом росте достоверно не установлена, предполагается, что они продуцируют цитокины, которые создают «иммуносупрессивную среду», подавляя пролиферацию противоопухолевых $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-лимфоцитов.

Выводы:

1. Начальный рост опухоли в головном мозге грызунов сопровождается преобладанием $CD4^+$ -клеток над $CD8^+$ -клетками в перитуморозной зоне глиальной опухоли головного мозга крыс в эксперименте.

2. С 14-х суток отмечается преобладание клеточной плотности макрофагов над клеточной плотностью лимфоцитов в перитуморозной зоне глиальной опухоли головного мозга крыс в эксперименте.

3. С 21-х суток отмечается снижение клеточной плотности $CD4^+$ -лимфоцитов и макрофагов и увеличение числа $CD8^+$ -макрофагов в перитуморозной зоне глиальной

опухоли головного мозга крыс в эксперименте.

4. Результаты проведенного исследования показали, что формирование «иммуносупрессивной среды» в перитуморозном пространстве глиальной опухоли головного мозга грызунов начинается по прошествии 14-и суток от имплантации опухолевых клеток глиомы С6.

Литература

1. ГОСТ 33044–2014. Принципы надлежащей лабораторной практики / Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации. – М.: Стандартинформ, 2019. – С. 3–9.
2. Byun, Y.H. Classification and Diagnosis of Adult Glioma: A Scoping Review / Y.H. Byun, C.K. Park // Brain Neurorehabil. – 2022. – Vol. 15, №3. – P. 3–23.
3. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment / F. Hanif [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. – 2017. – Vol. 18, №1. – P. 3–9.
4. Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma / S. Han [et al.] // Br J Cancer. – 2014. – Vol. 110, № 10. – P.2560–2568.
5. Tumor-Associated Microglia/Macrophages and CD8-Positive T Cells Plays a Key Role in Glioblastoma / S. Tu [et al.] // Front Immunol. – 2021. – Vol. 29, № 12. – P. 1–13.