

А. В. ВЕЛИЧКО^{1,2}, Е. М. НАЗАРЕНКО², Д. В. ЛУЦКОВИЧ³,
Д. Б. НИЖЕГОРОВА^{1,2}

КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ У ЛАБОРАТОРНОЙ МЫШИ

¹*Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь*

²*Институт клинической и экспериментальной медицины
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь*

³*РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии,
Минский р-н, д. Боровляны, Беларусь
E-mail: alesjswirskay@mail.ru*

Введение. Микроокружение опухоли представляет собой сложную систему, включающую фибробласты, раковые стволовые клетки, внеклеточный матрикс, а также иммунные клетки врожденного и приобретенного иммунитета, которые оказывают значительное влияние на развитие и прогрессирование новообразования [1]. Существующие противоречивые данные, характеризующие ТМЕ, обуславливают актуальность исследования клеточного состава и функциональных особенностей иммунных клеток в микроокружении опухоли на экспериментальных моделях злокачественных новообразований у лабораторных животных [2].

Цель исследования – охарактеризовать субпопуляционный состав иммунных клеток во вторичных лимфоидных органах у мышей с экспериментальной моделью нейробластомы.

Материалы и методы. Материалом исследования являлись селезенка и лимфатические узлы в микроокружении опухоли лабораторных мышей линии A/J с экспериментальной моделью нейробластомы ($n = 5$), которую индуцировали путем подкожной инъекции 1–2 млн клеток линии NXS2, выведенных из эксперимента на 25–30-е сутки с помощью 2%-го раствора тиопентала натрия. Иммунные клетки выделяли из лимфатических узлов и селезенки путем механической дезагрегации с последующей сепарацией на градиенте плотности с $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ (Carl Roth, Германия). Концентрацию клеток определяли с помощью гематологического анализатора (Sysmex XP-300, Япония). Субпопуляционный состав и относительное количество дендритных клеток (DCs – dendritic cells), опухоль-ассоциированных макрофагов (TAM – tumor-associated macrophages), субпопуляций Т-лимфоцитов, уровень экспрессии иммунной контрольной точки TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3) оценивали методом иммунофенотипирования с помощью моноклональных антител (таблица) и проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

Моноклональные антитела для оценки фенотипа иммунных клеток

Метод оценки	Тип клеток			
	DCs	TAM	Т-клетки	TIM-3
Иммунофенотипирование с помощью моноклональных антител	CD3-FITC	CD45-FITC	CD3-FITC	CD3-FITC
	MHCII-PC5	CD11b-PE	CD45-PE	TIM-3-PE
	CD11c-PC7	F4/80-PC5	CD4-PC5	CD8-PerCP
		Ly6G/Ly6C-PC7	CD8-APC	

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Statistica 8.0.

Результаты и их обсуждение. Субпопуляционный состав иммунных клеток идентифицировали с помощью следующих фенотипических маркеров: дендритные клетки с фенотипом $CD11c^+MHCII^+CD3^-$, опухоль-ассоциированные макрофаги с фенотипом $CD45^+CD11b^+F4/80^+Ly6G/Ly6C^-$, хелперные $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоциты, цитотоксические $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоциты и $CD3^+CD8^+TIM-3^+$ Т-лимфоциты.

Установлено, что в клеточной суспензии из лимфатического узла и селезенки экспериментальных животных преобладали лимфоциты (95,1 (89,5–97,3) и 90,0 (88,6–92,4) % соответственно), в то время как содержание гранулоцитов (1,8 (1,6–2,1) и 2,2 (1,9–2,5) % соответственно) и моноцитов (3,1 (2,9,0–3,4) и 7,8 (7,2–8,1) % соответственно) оставалось невысоким.

Концентрация DCs в клеточной суспензии лимфатического узла составила 11,16 (9,86–13,64) %, в то время как в селезенке регистрировался меньший

процент данной популяции клеток (1,4 (0,97–1,92) %). В то же время содержание ТАМ в лимфатическом узле снижалось на 0,47 (0,31–0,52) % относительно аналогичного показателя в селезенке (2,68 (2,01÷3,16) %) ($p < 0,05$).

Субпопуляционный анализ Т-лимфоцитов выявил, что в исследуемых вторичных органах доминировала субпопуляция Т-хелперов: 53,13 (51,66÷55,71) % $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов и 42,55 (39,41–45,36) % $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов – в лимфатических узлах и 61,12 (58,97–63,48) % $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов и 30,68 (27,91–33,14) % $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов – в селезенке ($p < 0,05$). При этом уровень экспрессии TIM-3 на $CD3^+CD8^+$ Т-клетках лимфатического узла отличался от такового на $CD3^+CD8^+$ Т-клетках селезенки (9,26 (7,92–10,47) и 3,19 (2,85–4,11) % соответственно, $p < 0,05$).

Таким образом, показано, что распределение клеток иммунной системы (DCs, ТАМ, Т-лимфоцитов) и уровень экспрессии TIM-3 у мышей с нейробластомой варьируется в зависимости от вторичных лимфоидных органов.

Выводы. Оценка клеточного состава опухолевого микроокружения у мышей линии A/J с экспериментальной моделью нейробластомы показала, что вторичные лимфоидные органы иммунной системы, такие как лимфатические узлы и селезенка, содержат преимущественно Т-лимфоциты, участвующие в противоопухолевом иммунитете. При этом с увеличением количества Т-киллерных клеток повышается экспрессия на них ингибиторной контрольной точки. Отличительной особенностью является более выраженное содержание DCs и сниженное количество ТАМ в лимфатических узлах по сравнению с клеточным составом селезенки у экспериментальных животных.

Литература

1. Itahashi, K. Regulatory T-cell development in the tumor microenvironment / K. Itahashi, T. Irie, H. Nishikawa // Eur. J. Immunol. – 2022. – Vol. 52, N 8. – P. 1216–1227.
2. Arneth, B. Tumor microenvironment / B. Arneth // Medicina. – 2019. – Vol. 56, N 1. – P. 15.

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Совет молодых ученых

МОЛОДЕЖЬ В НАУКЕ 2024

Тезисы докладов
XXI Международной
научной конференции
молодых ученых
(Минск, 29—31 октября 2024 г.)

В двух частях

Часть 2

Медицинские,
физико-
математические,
физико-технические
науки,
химия
и науки о Земле

Минск
«Беларуская навука»
2024