

УДК 576.5:616-006-006.04

ЭКСПРЕССИЯ TIM-3 ИММУННЫМИ КЛЕТКАМИ У МЫШЕЙ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА

А. В. ВЕЛИЧКО^{1),(2)}, Е. М. НАЗАРЕНКО²⁾, Д. В. ЛУЦКОВИЧ³⁾, Д. Б. НИЖЕГОРОДОВА²⁾

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

²⁾Белорусский государственный университет, НИИ экспериментальной и клинической медицины,
пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Беларусь

³⁾Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
ул. Фрунзенская 43, 223053, Боровляны, Минская обл., Беларусь

Т-клеточный иммуноглобулиновый и муциновый домен-3 (TIM-3) представляет собой ингибиторную иммунную контрольную точку, которая экспрессируется на иммунных и опухолевых клетках. Однако на сегодняшний день показана двойственная роль TIM-3: с одной стороны, рецептор действует как негативный регулятор противоопухолевого иммунитета и ассоциируется с более низкой выживаемостью онкологических пациентов, а с другой – может указывать на положительный прогноз при некоторых видах рака. Исследование проведено на мышях линии A/J с экспериментальной моделью нейробластомы. Клеточный состав вторичных органов иммунной системы и TIL (опухоль-инфильтрирующие лимфоциты), а также уровень экспрессии TIM-3 определяли с помощью метода проточной цитометрии и моноклональных антител. Статистическая обработка выполнена в *Statistica 8.0*. Вторичные лимфоидные органы иммунной системы (лимфатические узлы и селезенка) характеризовались преимущественным (более 90 %) содержанием лимфоцитов, в то время как остальные клетки идентифицировались как гранулоциты и моноциты / макрофаги во всех исследуемых группах. При этом содержание опухоль-ассоциированных макрофагов (TAM) статистически значимо повышалось в популяции TIL у мышей опытной группы. У мышей с экспериментальной моделью нейробластомы установлено снижение CD3⁺ Т-лимфоцитов в лимфатических узлах и селезенке относительно группы сравнения ($p = 0,01$) в сочетании с увеличением содержания CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Т-клеток в лимфатических узлах ($p = 0,01$). В экспериментальной группе отмечалось статистически значимое увеличение TIM-3 на CD3⁺ Т-лимфоцитах, преимущественно на CD3⁺CD8⁺ Т-клетках. Выявлена обратная взаимосвязь уровня экспрессии TIM-3 на CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитах и количества TAM ($R = -0,70$; $p = 0,02$) в лимфатических узлах, а также корреляция экспрессии TIM-3 на CD3⁺ Т-лимфоцитах селезенки и содержанием TAM у мышей с нейробластомой ($R = 0,90$; $p = 0,001$), что может являться потенциальным механизмом патологической иммунной толерантности в формировании онкологического процесса.

Ключевые слова: микроокружение опухоли; новообразование; иммунные клетки; экспериментальная модель; иммунные контрольные точки; Т-клеточный иммуноглобулиновый и муциновый домен-3.

Образец цитирования:

Величко АВ, Назаренко ЕМ, Луцкович ДВ, Нижегородова ДБ. Экспрессия TIM-3 иммунными клетками у мышей с экспериментальной моделью опухолевого процесса. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2025;4:42–51.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2025-4-42-51>

For citation:

Vialichka AV, Nazaranka EM, Lutskovich DV, Nizheharodava DB. Expression of TIM-3 by immune cells in mice with an experimental model of the tumor process. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2025;4:42–51. Russian.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2025-4-42-51>

Авторы:

Алеся Валерьевна Величко – аспирант кафедры иммунологии¹⁾; младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и биомедицинских технологий²⁾.

Елизавета Максимовна Назаренко – младший научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории.

Дмитрий Викторович Луцкович – научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.

Дарья Борисовна Нижегородова – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией иммунологии и биомедицинских технологий.

Authors:

Alesia V. Vialichka, graduate student at the department of immunology^a; junior researcher at the laboratory of immunology and biomedical technology^b.

alesjswirskay@mail.ru

Elizaveta M. Nazaranka, junior researcher at the laboratory of immunology and biomedical technology.

el.m.nazarenko@gmail.com

Dmitry V. Lutskovich, researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.

lutskovichdm@gmail.com

Darya B. Nizheharodava, PhD (biology), docent; head of the laboratory of immunology and biomedical technologies.

nzh@tut.by

EXPRESSION OF TIM-3 BY IMMUNE CELLS IN MICE WITH AN EXPERIMENTAL MODEL OF THE TUMOR PROCESS

A. V. VIALICHKA^{a, b}, E. M. NAZARANKA^b, D. V. LUTSKOVICH^c, D. B. NIZHEHARODAVA^b

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

^bBelarusian State Medical University, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine,
83 Dziarzhynsky Avenue, Minsk 220083, Belarus

^cRepublican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzenskaja Street, Borovlyany 223053, Minsk region, Belarus
Corresponding author: A. V. Vialichka (alesjswirskay@mail.ru)

T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 (TIM-3) is an inhibitory immune checkpoint that is expressed on immune and tumor cells. However, to date, the dual role of TIM-3 has been shown: on the one hand, the receptor acts as a negative regulator of antitumor immunity and is associated with a lower survival rate in cancer patients, and on the other hand, it may indicate a positive prognosis for certain types of cancer. The study was conducted on A/J mice with an experimental neuroblastoma model. The cellular composition of the secondary organs of the immune system and TIL (tumor-infiltrating lymphocytes), as well as the level of TIM-3 expression, were determined using flow cytometry and monoclonal antibodies. Statistical processing is performed in Statistica 8.0. The secondary lymphoid organs of the immune system (lymph nodes and spleen) were characterized by a predominant (more than 90 %) content of lymphocytes, while the remaining cells were identified as granulocytes and monocytes/macrophages in all the studied groups. At the same time, the content of tumor-associated macrophages (TAM) increased statistically significantly in the TIL population of mice in the experimental group. In mice with an experimental neuroblastoma model, a decrease in CD3⁺ T-lymphocytes in the lymph nodes and spleen was found relative to the comparison group ($p = 0.01$) in combination with an increase in CD3⁺CD4⁺CD8⁺ T-cells in the lymph nodes ($p = 0.01$). In the experimental group, there was a statistically significant increase in TIM-3 on CD3⁺ T-lymphocytes, mainly on CD3⁺CD8⁺ T-cells. An inverse relationship was found between the level of TIM-3 expression on CD3⁺CD8⁺ T-lymphocytes and the amount of TAM ($R = -0.70$; $p = 0.02$) in lymph nodes, as well as the correlation of TIM-3 expression on CD3⁺ T-lymphocytes of the spleen and TAM content in mice with neuroblastoma ($R = 0.90$; $p = 0.001$), which may be a potential mechanism of pathological immune tolerance in the formation of the oncological process.

Keywords: tumor microenvironment; neoplasm; immune cells; experimental model; immune checkpoints; T-cell immunoglobulin and mucin domain-3.

Введение

Злокачественные новообразования развиваются под воздействием разнообразных этиологических факторов, включая наследственную предрасположенность, генные мутации, хромосомные аномалии в сочетании с факторами окружающей среды (воздействие пестицидов и химических веществ, влияние токсичных веществ, содержащихся в воздухе, курение, алкоголь, медикаменты) [1].

В современной иммуноонкологии модели опухолей животных представляют ценность для экспериментального анализа, поскольку могут иметь свойства, сходные с характеристиками опухолей человека. На сегодняшний день существуют различные виды экспериментальных моделей новообразований: генетически модифицированные мышинные модели, в которых опухоли развиваются *de novo* в естественной микросреде; спонтанные модели, которые основаны на естественных мутациях или вирусах; индуцированные модели, созданные в результате химического, вирусного или радиационного воздействия; и такие трансплантируемые модели, как сингенные или модели ксенотрансплантатов. Экспериментальные модели опухолей на мышах способствуют пониманию ключевых механизмов противоопухолевого иммунного ответа организма, что служит базисом к последующей разработке новых стратегий лечения [2; 3].

В течение последних 5 лет пристальное внимание уделяется механизмам онкогенеза, опосредованным экспрессией иммунных контрольных точек, которые представляют собой молекулы-регуляторы иммунной системы и включают ряд ингибиторных иммунорецепторов: PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, TIGIT и BTLA. Это направление получило мировое признание в 2018 г. и отмечено Нобелевской премией по медицине за открытие CTLA-4 и PD-1 Джеймсом П. Эллисоном и Тасуку Хондзё [4; 5].

Во время роста опухоли из-за постоянного присутствия антигена и воспаления наступает дисфункциональное истощение Т-клеток, которое ассоциируется с повышением экспрессии различных ингибиторных рецепторов, включая Т-клеточный иммуноглобулиновый и муциновый домен-3 (TIM-3), которое приводит к подавлению пролиферации иммунных клеток и продукции цитокинов [1; 5].

Иммунная контрольная точка TIM-3 открыта в 2002 г. группой ученых под руководством С. Шэфер и Б. Танг и стала актуальной темой в последние годы в связи с его дифференциальной экспрессией в широком спектре новообразований. Рецептор TIM-3 представляет собой иммунорегуляторный рецептор, который экспрессируется на различных иммунных клетках, включая дендритные клетки, макрофаги и Т-клетки. TIM-3 опосредует подавляющую активность в отношении иммунных клеток через свои лиганды, включая фосфатидилсерин и лиганд галектин-9, а трансдукция сигнала в цитотоксических Т-клетках приводит к развитию фенотипа истощения [2; 3; 5].

Таким образом, цель данного исследования – оценка субпопуляционного клеточного состава и уровня экспрессии ингибиторной контрольной точки TIM-3 на иммунных клетках вторичных лимфоидных органов у мышей с экспериментальной моделью нейробластомы.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования явились лимфатические узлы и селезенка в микроокружении опухоли лабораторных мышей линии А/Ж с экспериментальной моделью нейробластомы ($n = 15$, группа 1) и здоровых мышей ($n = 10$, группа 2). Экспериментальную модель нейробластомы индуцировали путем подкожной инъекции 1–2 млн клеток линии NXS2 лабораторным мышам линии А/Ж. Животных выводили из эксперимента на 25–30 сут. 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 $\rho = 1,087 \text{ г/см}^3$ (Carl Roth, Германия). Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL – Tumor-infiltrating lymphocytes) выделяли с помощью диссоциатора суспензии отдельных клеток DSC-400 (RWD, Россия) и набора для изоляции TIL (Miltenyi Biotec, Германия). Концентрацию клеток определяли с помощью гематологического анализатора XP-300 (Sysmex, Япония). Субпопуляционный состав и относительное содержание Т-лимфоцитов, количество опухоль-ассоциированных макрофагов (TAM – опухоль-ассоциированные макрофаги), уровень экспрессии иммунной контрольной точки TIM-3 оценивали методом проточной цитометрии с помощью моноклональных антител (Elabscience, Китай) (табл. 1) и проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Statistica 8.0.

Таблица 1

Моноклональные антитела для оценки фенотипа иммунных клеток

Table 1

Monoclonal antibodies for evaluation of immune cell phenotype

Тип клеток	TAM	Т-клетки	TIM-3
Моноклональные антитела	CD45-FITC	CD3-FITC	CD3-FITC
	CD11b-PE	CD45-PE	TIM-3-PE
	F4/80-PC5	CD4-PC5	CD8-PerCP
	Ly6G/Ly6C-PC7	CD8-APC	

Результаты исследования и их обсуждение

Клеточный состав иммунных органов мышей с экспериментальной моделью нейробластомы. Клеточная суспензия из лимфатического узла экспериментальных мышей с моделью нейробластомы содержала лимфоциты 95,1 (89,5 ÷ 97,3) %, что статистически значимо не отличалось от группы сравнения (94,6 (93,6 ÷ 95,0) %, рис. 1а, 1з). Аналогично, не выявлено значимых изменений в суспензии спленоцитов: 90,0 (88,6 ÷ 92,4) % и 92,1 (90,5 ÷ 94,4) % соответственно (рис. 1б, 1д). При этом содержание CD3⁺Т-лимфоцитов у мышей с нейробластомой статистически значимо снижалось как в лимфатических узлах 57,21 (57,49 ÷ 97,04) %, так и в селезенке 22,68 (18,71 ÷ 25,97) % (рис. 1а, 1б) относительно группы сравнения (78,05 (54,50 ÷ 71,17) % и 34,5 (31,47 ÷ 37,85) % соответственно, $p = 0,01$, рис. 1з, 1д). У экспериментальных мышей количество CD3⁺ Т-лимфоцитов увеличивалось в лимфатических узлах и селезенке (42,80 (28,80 ÷ 45,61) % и 77,30 (74,03 ÷ 81,30) % соответственно, рис. 1а, 1б) в сравнении с контрольной группой (11,40 (3,10 ÷ 40,81) % и 63,80 (57,11 ÷ 67,20) % соответственно, $p = 0,01$, рис. 1з, 1д).

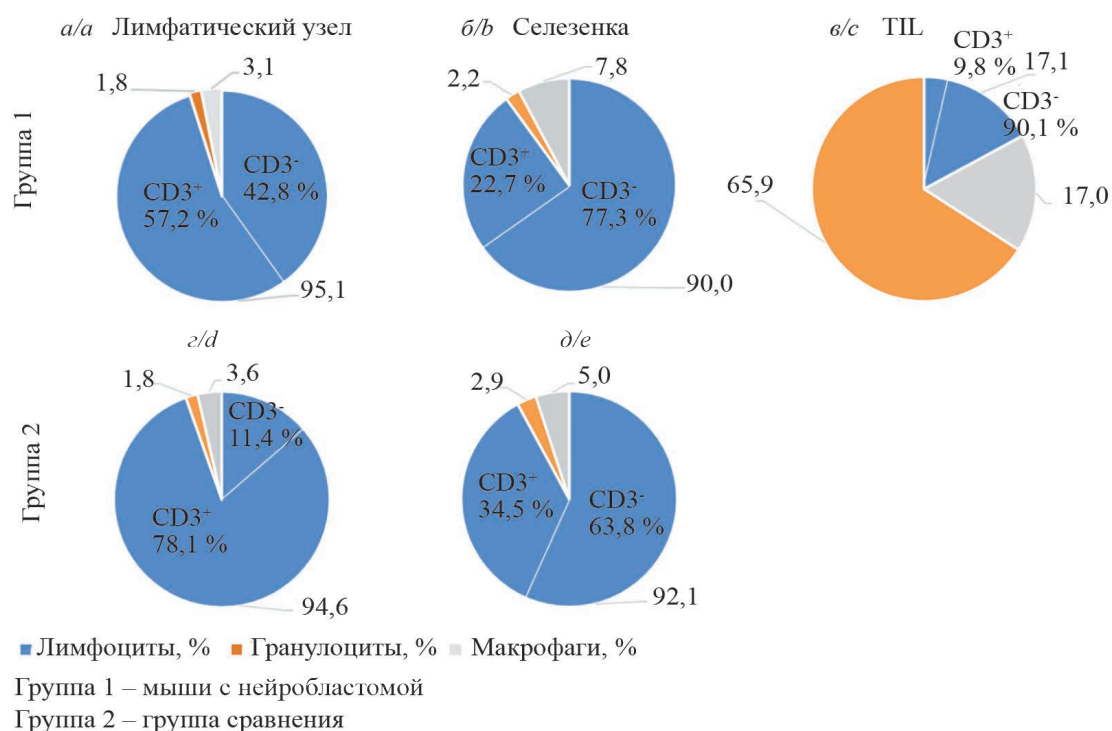


Рис. 1. Клеточный состав иммунных органов у мышей с экспериментальной моделью нейробластомы:
а – клеточный состав лимфатических узлов у мышей с нейробластомой; б – клеточный состав селезенки у мышей с нейробластомой; в – клеточный состав TIL у мышей с нейробластомой; з – клеточный состав лимфатических узлов у мышей группы сравнения; д – клеточный состав селезенки у мышей группы сравнения

Fig. 1. Cellular composition of immune organs in mice with an experimental model of neuroblastoma:
а – cellular composition of lymph nodes in mice with neuroblastoma; б – cellular composition of the spleen in mice with neuroblastoma; в – cellular composition of TIL in mice with neuroblastoma; з – cellular composition of lymph nodes in mice of the comparison group; д – cellular composition of the spleen in mice of the comparison group

Согласно Kushekhar, et al., микроокружение опухоли (ТМЕ) интенсивно инфильтрировано сложной сетью иммунных клеток, которая включает в себя врожденные клетки (макрофаги, тучные клетки, нейтрофилы, дендритные клетки, естественные киллеры, врожденные лимфоидные клетки и супрессорные клетки миелоидного происхождения) и Т- и В-лимфоциты адаптивного иммунитета. Однако важно учитывать клеточный состав вторичных лимфоидных органов иммунной системы, где происходит рециркуляция клеток иммунной системы, участвующих в онкоспецифическом иммунном ответе [6; 7].

Субпопуляция CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов играет важную роль в элиминации раковых клеток, секретируя различные провоспалительные цитокины, которые действуют как напрямую, так и косвенно, активируя и привлекая другие типы клеток, такие как макрофаги и гранулоциты, для элиминации рака. Однако субпопуляция CD3⁺CD8⁺ Т-киллеров представляет собой основной эффекторный механизм противоопухолевого иммунитета. С другой стороны, регуляторные Т-клетки участвуют в стимуляции роста опухоли, подавляя как Т-хелперы, так и Т-киллеры [6]. Данный гетерогенный состав клеток, их взаимодействие и секреция противовоспалительных или провоспалительных иммунных медиаторов создают иммунологически активное микроокружение опухоли. Именно клеточное распределение, их функциональный фенотип и секреция гуморальных факторов определяют либо регрессию опухоли, либо ее прогрессирование [7].

Важную роль в развитии противоопухолевого иммунного ответа выполняют клетки врожденного иммунитета. Исходя из этого, в нашем исследовании оценивали содержание гранулоцитов и моноцитов. Установлено, что процент содержания гранулоцитов в лимфатических узлах у исследуемой группы составлял 1,8 (1,6 ÷ 2,1) % и статистически значимо не различался от такового в группе сравнения (1,8 (1,7 ÷ 1,9) %) (рис. 1а, 1з). Аналогично, содержание гранулоцитов в селезенке у мышей с нейробластомой находилось на уровне 2,2 (1,9 ÷ 2,5) % и не отличалось от группы сравнения (2,9 (1,7 ÷ 4,4) %) (рис. 1б, 1д).

В ТМЕ нейтрофилы претерпевают значительные функциональные изменения: снижение продукции активных форм кислорода, снижение спонтанного апоптоза и изменение продукции цитокинов. Гранулоциты, в особенности нейтрофилы, могут способствовать росту опухоли с помощью различных механизмов, включая секрецию факторов роста: гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, тромбоцитарный фактор роста и макрофагальный воспалительный белок 1, которые стимулируют пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенеза, подавляют активность других иммунных клеток, таких как Т-киллеры [8; 9].

Содержание макрофагов в лимфатических узлах у мышей с моделью новообразования нейробластомы составляло (3,1 (2,9 ÷ 3,4) %), что не отличалось от группы сравнения (3,6 (3,3 ÷ 4,5) %), рис. 1а, 1г). При этом, относительное количество макрофагов в селезенке у исследуемой группы не изменялось (7,8 (7,2 ÷ 8,1) %) относительно группы сравнения (5,0 (3,1 ÷ 6,9) %) соответственно (рис. 1б, 1д).

Моноциты/макрофаги привлекаются в очаг новообразования в качестве воспалительных клеток с клеточными механизмами для непосредственного уничтожения злокачественных клеток и участвуют в TRAIL-опосредованном апоптозе посредством продукции интерферона альфа (IFN α). Они также способны стимулировать гибель раковых клеток посредством антитело-зависимого цитолиза и фагоцитоза, а также определять снижение инфильтрации цитотоксическими CD8⁺T-клетками [10]. Многочисленными авторами подтверждено, что моноциты/макрофаги могут быть ответственны за прогрессирование опухоли, включая ранние стадии роста опухоли и образование отдаленных метастазов. Jakubowska, et al. демонстрируют в модели злокачественных новообразований, что моноциты/макрофаги могут привлекаться к первичным опухолям и легочным метастазам в зависимости от CCL2 моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 [11; 12]. Они способны взаимодействовать с адаптивным иммунитетом, направляя рекрутирование и функцию лимфоцитов в ТМЕ посредством паракринной сигнализации и продукции воспалительных цитокинов и хемокинов, включая TNF α , IL-1, IL-6 и хемокиновый лиганд 3 [10; 11; 13].

Макрофаги, которые являются более дифференцированными моноцитами, развиваются из клеток мононуклеарной фагоцитарной линии и показывают специфические фенотипические характеристики. Роль макрофагов/моноцитов в развитии и прогрессировании рака является спорной, поскольку данные клетки обладают как ингибирующим, так и усиливающим потенциалом моноцитов при новообразованиях. Тем не менее, появляется все больше доказательств того, что ТАМ усиливают прогрессирование опухоли [11; 12].

Содержание ТАМ в лимфатических узлах и селезенке (0,47 (0,31 ÷ 0,52) % и 2,68 (2,01 ÷ 3,16) % соответственно) у мышей с нейробластомой статистически значимо не отличалось от группы сравнения (0,51 (0,45 ÷ 0,80) % и 2,35 (0,45 ÷ 3,31) % соответственно, табл. 3). Однако Pollard, et al. обнаружили, что ТАМ поддерживают миграцию, инвазию и интравазацию опухолевых клеток, а также ангиогенез, связанный с опухолью, и даже приводят к подавлению противоопухолевой иммунной реакции. Показано, что основной регулятор линии макрофагов, колониестимулирующий фактор 1, связан с худшим прогнозом при различных типах рака. ТАМ играют роль в метастазировании, опосредуя адгезию опухолевых клеток к эндотелию. Более того, первичные воспалительные макрофаги изменяются в опухоли с фенотипа на макрофаги, подобные тем, которые играют роль в регуляции формирования ткани во время развития. Все эти данные свидетельствуют о проопухолевом потенциале ТАМ, обусловленном формированием различных фенотипов макрофагов, способствующих злокачественному процессу [14– 16].

Определен клеточный состав TIL у мышей с нейробластомой и установлено, что содержание лимфоцитов снижалось в 5,1 раза относительно лимфатических узлов и селезенки и составляло 17,1 (14,0 ÷ 22,7) %, а количество гранулоцитов и макрофагов увеличивалось (65,9 (59,1 ÷ 70,0) % и 17,0 (14,7 ÷ 19,5) % соответственно, $p = 0,01$, рис. 1в). При этом содержание CD3⁺T-лимфоцитов у мышей с экспериментальной моделью новообразования снижалось до 9,82 (6,40 ÷ 21,85) % относительно вторичных иммунных органов, аналогично количество CD3⁺T-лимфоцитов повышалось до 90,12 (78,20 ÷ 93,60) %, $p = 0,01$ (рис. 1в). Наряду с увеличением количества макрофагов (табл. 2), выявлено, статистически увеличение содержания ТАМ в TIL у экспериментальных мышей до 3,22 (1,99 ÷ 3,91) % по сравнению с содержанием в клеточной суспензии лимфатических узлов и селезенки ($p = 0,03$).

Таблица 2

Количество ТАМ в лимфатических узлах, селезенке и TIL у мышей с экспериментальной моделью нейробластомы, %

Table 2

The amount of TAM in the lymph nodes, spleen and TIL in mice with an experimental model of neuroblastoma, %

	Лимфатический узел	Селезенка	TIL
Группа 1	0,47 (0,31 ÷ 0,52)	2,68 (2,01 ÷ 3,16)	3,22* (1,99 ÷ 3,91)
Группа 2	0,51 (0,45 ÷ 0,80)	2,35 (0,45 ÷ 3,31)	

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно лимфатических узлов и селезенки.

TIL представляют собой важнейший компонент ТМЕ, играя центральную роль в иммунитете опухоли и влияя на прогрессирование рака. TIL представляют собой разнообразную группу иммунных клеток, которые

инфильтрируют опухолевые ткани, и их роль может быть как провоспалительной, так и иммуносупрессивной в зависимости от контекста и конкретных типов присутствующих ТИЛ. Ключевые субпопуляции ТИЛ включают цитотоксические Т-лимфоциты CD8⁺, Т-хелперные Т-клетки CD4⁺, регуляторные Т-клетки, В-клетки и естественные киллеры (NK), каждая из которых играет свою роль в формировании противоопухолевого иммунитета. Данные иммунные клетки проникают в опухоли и динамически модулируют противоопухолевые ответы посредством прямой цитотоксической активности, презентации антигена и секреции цитокинов [17; 18].

Субпопуляционная характеристика Т-лимфоцитов во вторичных иммунных органах и ТИЛ у мышей с нейробластомой. В связи с отсутствием статистически значимых различий в лимфатических узлах и селезенке при развитии злокачественного новообразования проведена субпопуляционная характеристика Т-лимфоцитов у мышей с экспериментальной моделью нейробластомы. С использованием проточной цитометрии охарактеризованы субпопуляции ткане-резидентных Т-лимфоцитов: CD3⁺CD4⁺Т-хелперы (Th), цитотоксические CD3⁺CD8⁺Т-лимфоциты (CTL), двойные позитивные CD4⁺CD8⁺Т-лимфоциты (DP) и двойные негативные CD4⁺CD8⁺Т-лимфоциты (DN). Количество Т-клеток субпопуляций исследуемых групп представлено в табл. 3.

Таблица 3

Количество Т-лимфоцитов в лимфатических узлах, селезенке и ТИЛ у мышей с нейробластомой и контрольной группе

Table 3

The number of T-lymphocytes in lymph nodes, spleen and TIL in mice with neuroblastoma and control group

Субпопуляции	Группы	Лимфатический узел	Селезенка	ТИЛ
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Th, %	1	53,20 (53,05 ÷ 55,63)	60,91* (59,94 ÷ 64,34)	10,48 (4,70 ÷ 37,87)
	2	48,83 (40,43 ÷ 62,13)	46,00 (44,97 ÷ 57,17)	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CTL, %	1	28,57 (22,58 ÷ 42,90)	29,04 (20,33 ÷ 29,57)	8,50 (7,05 ÷ 20,88)
	2	30,34 (14,98 ÷ 46,20)	27,49 (23,82 ÷ 29,20)	
CD4 ⁺ CD8 ⁺ DP, %	1	0,76 (0,23 ÷ 0,97)	0,21 (0,16 ÷ 0,50)	0,94 (0,06 ÷ 2,35)
	2	0,92 (0,69 ÷ 1,17)	0,46 (0,37 ÷ 0,78)	
CD4 ⁺ CD8 ⁺ DN, %	1	11,62* (3,72 ÷ 17,53)	10,34* (7,88 ÷ 14,21)	81,00 (41,48 ÷ 85,63)
	2	6,44 (4,64 ÷ 29,78)	25,08 (17,67 ÷ 26,03)	

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно группы сравнения.

Доминирующими субпопуляциями во всех исследованных группах являлись хелперные CD3⁺CD4⁺Т-лимфоциты. Соотношение CD3⁺CD4⁺Т-лимфоцитов и CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов (иммунорегуляторный индекс) во вторичных органах повышался у мышей с нейробластомой по сравнению с контрольной группой как в селезенке (2,09 (1,56 ÷ 3,64) vs 1,67 (1,25 ÷ 2,08), $p = 0,01$), так и в лимфатических узлах (1,86 (1,40 ÷ 2,33) vs 1,61 (1,46 ÷ 2,01), $p = 0,03$), что может косвенно быть связано с увеличением количества регуляторных клеток. В то время как состав ТИЛ у мышей с нейробластомой включал только 10,48 (4,70 ÷ 37,87) % хелперных CD3⁺CD4⁺Т-клеток и 8,50 (7,05 ÷ 20,88) % CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов.

CD4⁺Т-клетки составляют основную субпопуляцию лимфоцитов и играют ключевую роль в координации адаптивного иммунного ответа. Благодаря секреции γ -интерферона (IFN γ), фактора некроза опухоли α (TNF α) и интерлейкина 2 (IL-2) эти клетки усиливают цитотоксичность CD8⁺Т-клеток, способствуют поляризации Th1 и облегчают презентацию опухолевого антигена. После активации презентацией антигена наивные CD4⁺Т-клетки дифференцируются в эффекторные субпопуляции в зависимости от цитокиновых сигналов и условий окружающей среды. Среди них Th1-клетки играют ключевую роль в противоопухолевых реакциях, запускаемых IL-12 и опосредованных сигнальными путями STAT, что приводит к экспрессии T-bet и продукции провоспалительных цитокинов. Эти цитокины привлекают и активируют дополнительные иммунные эффекторы, усиливая локальный иммунитет [19–21].

Т-клетки CD8⁺ являются одними из наиболее распространенных эффекторных клеток в опухолях, где дифференцируются в CTL при презентации антигена дендритными клетками или другими антигенпрезентирующими клетками. После активации CTL высвобождают цитолитические гранулы, содержащие перфорин и гранзимы, инициируя апоптоз в опухолевых клетках, предназначенных для разрушения опухоли. Отсутствие статистически значимых различий в данном исследовании указывает на несостоятельность противоопухолевой киллерной защиты или иммунологическое истощение киллерных механизмов в результате постоянного воздействия опухолевых антигенов. При этом, высокая плотность CTL коррелирует

с благоприятным прогнозом при многих типах опухолей, а наличие субпопуляций памяти связано с уменьшением метастазирования и улучшением безрецидивной выживаемости [18; 20; 21].

Обнаружено статистически значимое снижение количества DN Т-лимфоцитов в селезенке по сравнению с группой сравнения ($p = 0,01$). В то же время анализ суспензии клеток лимфатических узлов и ТИЛ выявил увеличение количества DN Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой ($p = 0,01$). При этом клеточный состав ТИЛ у мышей с нейробластомой практически полностью состоял из DN Т-клеток 81,00 ($41,48 \div 85,63$) % и статистически значимо отличался от уровня DN Т-клеток в селезенке, лимфатических узлах ($p = 0,01$). Содержание DP Т-клеток в исследуемых группах не отличалось как во вторичных органах иммунной системы, так и в ТИЛ.

DN Т-клетки выполняют общие функции с различными типами дифференцированных субпопуляций Т-клеток, например, Т-хелперы-подобные DN Т-клетки секретируют цитокины, включая IL-4, IL-17, γ IFN и TNF α и играют роль, сходную с CD4⁺Т-клетками, цитотоксические DN Т-клетки продуцируют γ IFN, перфорин и гранзим В, опосредующие цитотоксический при злокачественных новообразованиях [22; 23]. Согласно Zhiheng Wu, et al., Т-клетки DN могут секретировать IL-10, обладающий подавляющим потенциалом, в глиоме и меланоме мыши. Наличие DN ТИЛ также продемонстрировано при метастазировании в лимфатические узлы пациентов с меланомой, и значительное увеличение DN ТИЛ обнаружено в лимфатических узлах пациентов с меланомой, у которых наблюдалось прогрессирование заболевания, по сравнению с пациентами без него, что привело к гипотезе о вкладе DN ТИЛ в метастатическое прогрессирование опухоли [23; 24].

Экспрессия ингибиторной контрольной точки TIM-3 на иммунных клетках у мышей с нейробластомой. На иммунных клетках лимфатических узлов у мышей с нейробластомой экспрессия TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах статистически значимо не различалась и оставалась на низком уровне (рис. 2а, 2г). В то же время, как в селезенке экспрессия TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах повышалась относительно группы сравнения (27,21 ($12,95 \div 47,63$) и 4,41 ($2,50 \div 5,31$) % соответственно, $p = 0,01$, рис. 2б, 2д). При этом ТИЛ характеризовались высокой экспрессией TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах (рис. 2в), что статистически значимо отличалось от вторичных иммунных органов.

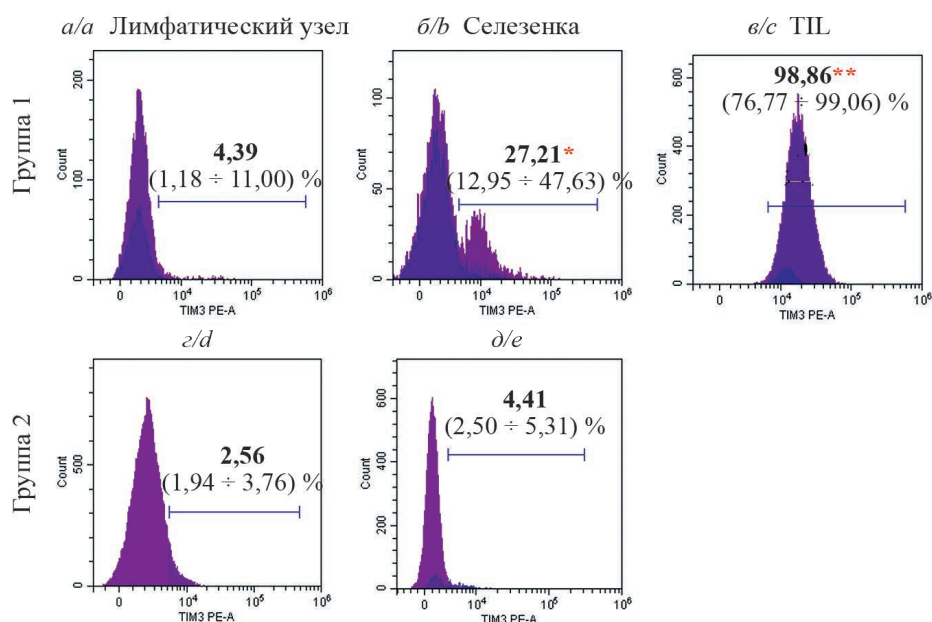


Рис. 2. Экспрессия TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах во иммунных органах и ТИЛ у мышей с экспериментальной моделью нейробластомы: а – экспрессия TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах лимфатических узлов у мышей с нейробластомой; б – экспрессия TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах селезенки у мышей с нейробластомой; в – экспрессия TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах ТИЛ у мышей с нейробластомой; г – экспрессия TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах лимфатических узлов у мышей группы сравнения; д – экспрессия TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах селезенки у мышей группы сравнения

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно группы сравнения.

Fig. 2. TIM-3 expression on CD3⁺T-lymphocytes in immune organs and TIL in mice with an experimental neuroblastoma model: а – TIM-3 expression on CD3⁺T-lymphocytes of lymph nodes in mice with neuroblastoma; б – TIM-3 expression on CD3⁺T-lymphocytes of the spleen in mice with neuroblastoma; в – TIM-3 expression on CD3⁺T-lymphocytes of TIL in mice with neuroblastoma; г – TIM-3 on CD3⁺T-lymphocytes of lymph nodes in mice of the comparison group; е – expression of TIM-3 on CD3⁺T-lymphocytes of the spleen in mice of the comparison group

Note. * – $p < 0,05$ relative to the comparison group.

В исследуемой группе животных с новообразованием показано снижение экспрессии TIM-3 на CD3⁺CD8⁺T-лимфоцитах в лимфатическом узле (1,69 (1,39 ÷ 19,64) %) относительно здоровых мышей (3,39 (1,10 ÷ 31,74) %, $p = 0,01$, рис. 3а, 3г) и увеличение уровня экспрессии TIM-3 на CD3⁺CD8⁺T-лимфоцитах селезенки (30,93 (14,12 ÷ 33,94) %) относительно с группой сравнения (12,68 (4,00 ÷ 32,53) %, $p = 0,01$, рис. 3б, 3д). При этом большинство TIL, полученных из нейробластомы, характеризовались высоким уровнем экспрессии TIM-3 95,46 (60,27 ÷ 99,34) %, что может являться потенциальным механизмом патологической иммунной толерантности (рис. 3в).

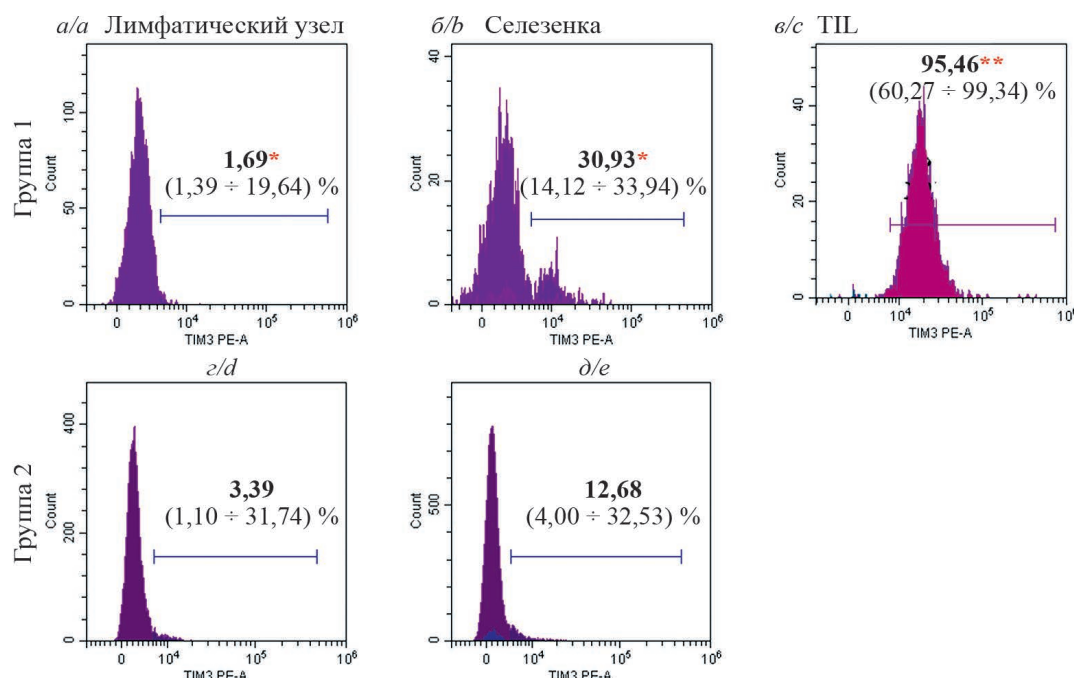


Рис. 3. Экспрессия TIM-3 на CD3⁺CD8⁺T-лимфоцитах в иммунных органах и TIL у мышей с экспериментальной моделью нейробластомы: а – экспрессия TIM-3 на CD3⁺CD8⁺T-лимфоцитах лимфатических узлов у мышей с нейробластомой; б – экспрессия TIM-3 на CD3⁺CD8⁺T-лимфоцитах селезенки у мышей с нейробластомой; в – экспрессия TIM-3 на CD3⁺CD8⁺T-лимфоцитах TIL у мышей с нейробластомой; г – экспрессия TIM-3 на CD3⁺CD8⁺T-лимфоцитах лимфатических узлов у мышей группы сравнения; д – экспрессия TIM-3 на CD3⁺CD8⁺T-лимфоцитах селезенки у мышей группы сравнения

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно группы сравнения; ** – $p < 0,01$ относительно группы сравнения.

Fig. 2. TIM-3 expression on CD3⁺CD8⁺T-lymphocytes in immune organs and TIL in mice with an experimental neuroblastoma model: а – TIM-3 expression on CD3⁺CD8⁺T-lymphocytes of lymph nodes in mice with neuroblastoma; б – TIM-3 expression on CD3⁺CD8⁺T-lymphocytes of the spleen in mice with neuroblastoma; в – TIM-3 expression on CD3⁺CD8⁺T-lymphocytes of TIL in mice with neuroblastoma; г – TIM-3 on CD3⁺CD8⁺T-lymphocytes of lymph nodes in mice of the comparison group; д – expression of TIM-3 on CD3⁺CD8⁺T-lymphocytes of the spleen in mice of the comparison group

Note. * – $p < 0,05$ relative to the comparison group; ** – $p < 0,01$ relative to the comparison group.

У мышей с экспериментальной моделью нейробластомы установлено увеличение экспрессии TIM-3 на CD3⁺-клетках селезенки по сравнению с группой сравнения (19,75 (10,13 ÷ 29,21) и 1,72 (0,85 ÷ 5,95) % соответственно, $p = 0,01$), в то время как статистически значимые различия экспрессии TIM-3 не выявлены на CD3⁺-клетках лимфатических узлов исследуемых групп (1,32 (0,39 ÷ 10,54) и 2,22 (0,86 ÷ 6,55) %), при этом уровень TIM-3 на CD3⁺-клетках TIL составлял 13,77 (7,56 ÷ 35,52) %.

CD3⁺-клетки не экспрессируют на своей поверхности белковый комплекс CD3, который является определяющим маркером Т-лимфоцитов. К CD3⁺-клеткам относятся В-лимфоциты, NK-клетки. NK-клетки в основном обнаруживаются во вторичных лимфоидных органах, напрямую повреждая клетки, идентифицированные как опухолевые, инфицированные или подверженные стрессу, путем высвобождения цитотоксических гранул, содержащих перфорин и гранзим В. Кроме того, NK-клетки индуцируют апоптоз, экспрессируя рецепторы смерти, такие как лиганд Fas (FasL) и связанный с фактором некроза опухоли лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL). Однако признаком истощения NK-клеток, состояния дисфункции, которое ухудшает противоопухолевые реакции является высокая экспрессия TIM-3 при многих видах рака. Dao, et al. демонстрируют, что TIM-3 может нарушать цитотоксичность NK-клеток или усиливать продукцию γ IFN [24–26].

Иммунные контрольные точки – важный компонент опухолевого микроокружения. TIM-3 является ингибиторной иммунной точкой, которая отрицательно регулирует врожденный и адаптивный

иммунитет и выступает в роли маркера дисфункции иммунных клеток при раке. TIM-3 экспрессируется на Т-лимфоцитах, дендритных клетках, моноцитах, NK-клетках и TIL, что согласуется с полученными нами данными [27; 28].

У мышей с экспериментальной моделью нейробластомы выявлена обратная взаимосвязь, с увеличением уровня экспрессии TIM-3 на CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитах снижается содержание ТАМ в лимфатических узлах и с увеличением экспрессии TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах селезенки повышается количество ТАМ, что свидетельствует о несостоятельности иммунного ответа, при этом в TIL корреляция с ТАМ не установлена. Однако установлено, что со снижением количества лимфоцитов и увеличением макрофагов в TIL снижается экспрессия TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах, указывающая на активное участие ТАМ в иммунном ответе (табл. 3).

Таблица 3

Корреляция количества иммунных клеток с уровнем экспрессии TIM-3 у мышей с нейробластомой

Table 3

Correlation of the number of immune cells with the level of TIM-3 expression in mice with neuroblastoma

		TIM-3 ⁺ CD3 ⁺ Т-клетки	TIM-3 ⁺ CD3 ⁺ 8 ⁺ Т-клетки
Лимфатический узел	ТАМ	н/з	$R = -0,70$ $p = 0,02$
Селезенка	ТАМ	$R = 0,90$ $p = 0,001$	н/з
TIL	Лимфоциты	$R = 0,80$ $p = 0,02$	н/з

Примечание. н/з – статистически незначимые различия.

В последнее время все больше доказательств свидетельствуют, что экспрессия TIM-3 повышается при колоректальном раке, раке желудка, немелкоклеточном раке легких и других злокачественных опухолях. TIM-3 присоединяет свойственные лиганды: галектин-9, молекулы адгезии клеток ракового эмбрионального антигена 1, фосфатидилсерин, белок группы высокой подвижности 1 и действует как негативный регулятор Th1 типа и цитотоксических лимфоцитов. Некоторые авторы демонстрируют, что повышенная экспрессия TIM-3 в иммунных клетках положительно коррелирует с более высокими степенями злокачественности опухоли и плохой выживаемостью у мышей с новообразованиями. TIM-3 оказывает протумогенное действие посредством активации NF-κB/IL-6/STAT3 пути. Однако механизмы, которые TIM-3 использует для модуляции иммунитета при новообразованиях, до конца не изучены, в связи с гетерогенностью внутриметаболических каскадов [24; 27; 28].

Заключение

В данном исследовании определен клеточный состав опухолевого микроокружения у мышей линии А/Ж с экспериментальной моделью нейробластомы и показано, что вторичные лимфоидные органы иммунной системы (лимфатические узлы и селезенка) преимущественно содержат Т-лимфоциты, являющиеся ключевыми в противоопухолевом иммунитете. Выявлены изменения в составе субпопуляций тканерезидентных Т-клеток у мышей с нейробластомой, характеризующие преобладание DN Т-клеток среди TIL, что указывает на их тесную связь с образованием и развитием опухоли. Особенностью является сниженное количество ТАМ в лимфатических узлах по сравнению с клеточным составом селезенки у экспериментальных животных.

У мышей линии А/Ж с нейробластомой наблюдается увеличение экспрессии ингибиторной контрольной точки TIM-3 на иммунных клетках вторичных лимфоидных органов, преимущественно в селезенке, и в меньшей степени в лимфатических узлах. Выявлено, что в лимфатических узлах с увеличением уровня экспрессии TIM-3 на CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитах снижается содержание ТАМ, в то время как в селезенке с увеличением экспрессии TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах повышается количество ТАМ у мышей с нейробластомой, что свидетельствует о несостоятельности иммунного ответа. При этом установлено, что со снижением количества лимфоцитов и увеличением макрофагов в TIL снижается экспрессия TIM-3 на CD3⁺Т-лимфоцитах. Таким образом, полученные данные указывают на несостоятельность цитотоксических лимфоцитов в микроокружении опухоли и, предположительно, обуславливают иммунологическое «молчание» противоопухолевого иммунитета в отношении злокачественного новообразования.

Библиографические ссылки / References

1. Hecka J, Parka AS, Qiu J. An exploratory study of ambient air toxics exposure in pregnancy and the risk of neuroblastoma in offspring. *Environmental Research*. 2013;127:1–6. DOI: 10.1016/j.envres.2013.09.002.
2. Ducimetee L, Vermeer M, Tugues S. The Interplay Between Innate Lymphoid Cells and the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1–11. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02895.
3. Haas L, Obenaus AC. Allies or Enemies-The Multifaceted Role of Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1–11. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02746.
4. Habanjar O, Bingula R, Decombat C. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(4):1–40. DOI: 10.3390/ijms24044002.
5. Talvard-Balland N, Braun L, Dixon K. Oncogene-induced TIM-3 ligand expression dictates susceptibility to anti-TIM-3 therapy in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2024;134(16):1–17. DOI: 10.1172/JCI177460.
6. Kushekhar K, Chellappa S, Aandahl E. Role of Lymphocytes in Cancer Immunity and Immune Evasion Mechanisms. *Biomarkers of the Tumor Microenvironment*. 2022;37:159–182. DOI: 10.1007/978-3-030-98950-7_10
7. Habanjar O, Bingula R, Decombat C. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(4):1–40. DOI: 10.3390/ijms24044002.
8. Shaul ME, Fridlender ZG. Cancer-related circulating and tumor-associated neutrophils – subtypes, sources and function. *The Microbiome in Health and Disease*. 2018;285:4316–4342. DOI: 10.1111/febs.14524.
9. Osipov A, Saung MT, Zheng L. Small molecule immunomodulation: the tumor microenvironment and overcoming immune escape. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2019;7(1):1–12. DOI: 10.1186/s40425-019-0667-0.
10. SenGupta S, Hein LE, Parent CA. The Recruitment of Neutrophils to the Tumor Microenvironment Is Regulated by Multiple Mediators. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:1–10. DOI: 10.3389/fimmu.2021.734188.
11. Jakubowska K, Koda M, Grudzińska M. Monocyte-to-lymphocyte ratio as a prognostic factor in peripheral whole blood samples of colorectal cancer patients. *World Journal of Gastroenterology*. 2020;26(31):4639–4655. DOI: 10.3748/wjg.v26.i31.4639.
12. Jeong J, Suh Y, Jung K. Context Drives Diversification of Monocytes and Neutrophils in Orchestrating the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1–20. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01817.
13. Messex JK, Byrd CJ, Liou GY. Signaling of Macrophages that Contours the Tumor Microenvironment for Promoting Cancer Development. *Cells*. 2020;9(4):1–15. DOI: 10.3390/cells9040919.
14. Laumont CM, Nelson BH. B cells in the tumor microenvironment: Multi-faceted organizers, regulators, and effectors of anti-tumor immunity. *Cancer Cell*. 2023;41(3):466–489. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.02.017.
15. Zheng Z, Wieder T, Mauerer B. T Cells in Colorectal Cancer: Unravelling the Function of Different T Cell Subsets in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(14):1–35. DOI: 10.3390/ijms241411673.
16. Li C, Jiang P, Wei S. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer*. 2020;19(1):1–23. DOI: 10.1186/s12943-020-01234-1.
17. Kraja F, Jurisic VB, Hromić-Jahjefendić H. Tumor-infiltrating lymphocytes in cancer immunotherapy: from chemotactic recruitment to translational modeling. *Frontiers Immunology*. 2025;16: 1–21. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1601773.
18. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*. 2019;79(18):4557–4566. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.
19. Wang H, Yung MH, Ngan HS. The Impact of the Tumor Microenvironment on Macrophage Polarization in Cancer Metastatic Progression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(12):1–19. DOI: 10.3390/ijms22126560.
20. Haas L, Obenaus AC. Allies or Enemies-The Multifaceted Role of Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1–11. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02746.
21. Codrici E, Popescu ID, Tanase C. Friends with Benefits: Chemokines, Glioblastoma-Associated Microglia/Macrophages, and Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(5):1–36. DOI: 10.3390/ijms23052509.
22. Hagen M, Pangrazzi L, Rocamora-Reverte L. Legend or Truth: Mature CD4⁺CD8⁺ Double-Positive T Cells in the Periphery in Health and Disease. *Biomedicine*. 2023;11:1–11. DOI: 10.3390/biomedicine11102702.
23. Wu Z, Zheng Y, Sheng J. CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Double-Negative T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1–14. DOI: 10.3389/fimmu.2022.816005.
24. Neophytou CM, Panagi M, Stylianopoulos T. The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Cancers*. 2021;13:1–22. DOI: 10.3390/cancers13092053.
25. Arnetz B. Tumor Microenvironment. *Medicina*. 2019;56(1):1–15. DOI: 10.3390/medicina56010015.
26. Itahashi K, Irie T, Nishikawa H. Regulatory T-cell development in the tumor microenvironment. *European Journal of Immunology*. 2022;52(8):1216–1227. DOI: 10.1002/eji.202149358.
27. Pagliano O, Morrison R, Chauvin J. Tim-3 mediates T cell trogocytosis to limit antitumor immunity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2022;132(9):1–16. DOI: 10.1172/JCI152864.
28. Qin S, Dong B, Yi M. Prognostic Values of TIM-3 Expression in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis and Database Evaluation. *Frontiers in Oncology*. 2020;10(1288):1–13. DOI: 10.3389/fonc.2020.01288.

Статья поступила в редколлегию 25.08.2025.
Received by editorial board 25.08.2025.