

EDN: HQRVGA

УДК: 616.831-006, 615, 616.8-089

DOI: 10.56618/2071-2693_2024_16_3_104



ВЛИЯНИЕ ПЛЕРИКСАФОРА НА МИГРАЦИЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ОПУХОЛЕВЫЙ ОЧАГ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ КРЫС С ГЛИОМОЙ С6 (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Олег Игоревич Пак¹

pak.oi@dvfu.ru, orcid.org/0000-0002-1312-8308, SPIN-код: 4027-9171

Александра Асадовна Косьянова¹

kosianova.a@dvfu.ru, orcid.org/0000-0001-5655-5855, SPIN-код: 3639-3618

Сергей Викторович Зайцев¹

zaitcev.svi@dvfu.ru, orcid.org/0000-0002-0690-7389, SPIN-код: 8566-4916

Игорь Степанович Брюховецкий¹

bruhovetsky@mail.ru, orcid.org/0000-0003-3654-3069, SPIN-код: 7949-4676

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (пр. Океанский, д. 39, г. Владивосток, Российская Федерация, 690090)

Резюме

ВВЕДЕНИЕ. Глиобластома (ГБ) – смертоносная рецидивирующая глиальная опухоль.**ЦЕЛЬ.** Изучить влияние CXCR4-ингибитора плериксафора на процессы хоуминга стволовых клеток костного мозга (СККМ) в опухолевый очаг и оценить выживаемость животных после химиолучевой терапии (ХЛТ).**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Использованы клетки линии С6 и крысы породы Вистар. Применяли методы культуральной, проточной цитометрии, экспериментальной хирургии, ХЛТ, морфологического, иммуногистохимического и иммуноферментного анализа, оценки выживаемости по Каплану – Майеру.**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) крысам с глиомой С6 увеличивает содержание СККМ в кровотоке в 24,4 раза, комбинация Г-КСФ и плериксафора (ПЛФ) – в 32,9 раза. Стимуляция Г-КСФ усиливает содержание пролиферирующих клеток в опухоли и обогащает ее маркерами микроглии, что сопровождается повышением содержания TGFβ1 – (82,4±11,4) нг/мл (против (38,8±16,3) нг/мл в контроле), белков wnt3A и wnt5A – (52,2±6,4) и (100±11,2) нг/мл соответственно (против (18,6±9,4) и (38,6±14,2) нг/мл в контроле) и β-катенина – (174±11,2) нг/мл (против (82,2±16,4) нг/мл в контроле). Данный эффект отсутствует у крыс, получавших Г-КСФ и ПЛФ. Медиана выживаемости крыс, получавших ХЛТ, – 35 дней: крыс ХЛТ + Г-КСФ или ПЛФ – 49 и 51 день, ХЛТ + Г-КСФ + ПЛФ – 64 дня.**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Плериксафор усиливает рекрутирующее действие Г-КСФ на СККМ, нарушает процессы их миграции и хоуминга в неопластический очаг, что сопровождается уменьшением числа пролиферирующих элементов и клеток микроглии, снижением содержания TGFβ1, wnt-лигандов и β-катенина в веществе мозга и увеличением выживаемости экспериментальных животных с глиомой С6.**Ключевые слова:** глиобластома, опухолевые стволовые клетки, стволовые клетки костного мозга, микроокружение, микроглия, плериксафор

Для цитирования: Пак О. И., Косьянова А. А., Зайцев С. В., Брюховецкий И. С. Влияние плериксафора на миграцию стволовых клеток иммунной системы в опухолевый очаг и выживаемость крыс с глиомой С6 (экспериментальное исследование) // Российский нейрохирургический журнал им. проф. А. Л. Поленова. 2024. Т. XVI, № 3. С. 104–113. DOI: 10.56618/2071-2693_2024_16_3_104.

THE EFFECT OF PLERIXAFOR ON THE MIGRATION OF IMMUNE STEM CELLS INTO THE TUMOR SITE AND SURVIVAL OF RATS WITH C6 GLIOMA (EXPERIMENTAL STUDY)

Oleg I. Pak¹

pak.oi@dvfu.ru, orcid.org/0000-0002-1312-8308, SPIN-code: 4027-9171

Aleksandra A. Kosianova¹

kosianova.a@dvfu.ru, orcid.org/0000-0001-5655-5855, SPIN-code: 3639-3618

Sergei V. Zaitsev¹

✉ zaitcev.svi@dvfu.ru, orcid.org/0000-0002-0690-7389, SPIN-code: 8566-4916

Igor S. Bryukhovetskiy¹

bruhovetskiy@mail.ru, orcid.org/0000-0003-3654-3069, SPIN-код: 7949-4676

¹ Far Eastern Federal University (39 Okeansky Avenue, Vladivostok, Russian Federation, 690090)**Abstract****INTRODUCTION.** Glioblastoma (GB) is a lethal recurrent glial tumor.**AIM.** To study the effect of the CXCR4 inhibitor plerixafor on the processes of homing of bone marrow stem cells (BMSCs) into the tumor site and to evaluate the survival of animals after chemoradiotherapy (CRT).**MATERIALS AND METHODS.** C6 cells and Wistar rats were used. The experiment was approved by the local ethics committee. The methods used were cultural, flow cytometry, experimental surgery, CRT, morphological, immunohistochemical and enzyme-linked immunosorbent analysis, Kaplan – Meier survival assessment.**RESULTS.** Administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) to rats with C6 glioma increases the content of BMSCs in the bloodstream by 24.4 times, the combination of G-CSF and plerixafor (PLX) – by 32.9 times. Stimulation with G-CSF increases the content of proliferating cells in the tumor and enriches it with microglial markers, which is accompanied by an increase in the content of TGFβ1 82.4±11.4 ng/ml (versus 38.8±16.3 ng/ml in the control), wnt3A and wnt5A – 52.2±6.4 and 100±11.2 ng/ml (versus 18.6±9.4 and 38.6±14.2 ng/ml in control) and β-catenin – 174±11.2 ng/ml (versus 82.2±16.4 ng/ml in the control). This effect is absent in rats treated with G-CSF and PLF. The median survival of rats receiving CRT was 35 days: rats receiving CRT + G-CSF or PLX were 49 and 51 days, CRT + G-CSF + PLF was 64 days.**CONCLUSIONS.** Plerixafor enhances the recruiting effect of G-CSF on BMSCs, disrupts the processes of their migration and homing into the neoplastic lesion, which is accompanied by a decrease in the number of proliferating elements and microglial cells, a decrease in the content of TGFβ1, wnt ligands and β-catenin in the brain substance and an increase in experimental survival animals with C6 glioma.**Keywords:** glioblastoma, tumor stem cells, bone marrow stem cells, microenvironment, microglia, plerixafor**For citation:** Pak O. I., Kosyanova A. A., Zaitsev S. V., Bryukhovetskiy I. S. The effect of plerixafor on the migration of immune stem cells into the tumor site and survival of rats with C6 glioma (experimental study). *Russian neurosurgical journal named after professor A. L. Polenov.* 2024;XVI(3):104–113. DOI: 10.56618/2071-2693_2024_16_3_104.**Введение**

Глиобластома (ГБ) – одна из самых смертоносных опухолей головного мозга. Хирургическая операция и химиолучевая терапия (ХЛТ) обеспечивают ремиссию 4–6 месяцев, медиана общей выживаемости больных – 15 месяцев [1]. Рецидив и прогрессирование опухоли связывают [2] со способностью клеток ГБ взаимодействовать со стволовыми клетками костного мозга (СККМ) – одним из важнейших компонентов микроокружения неопластических клеток [3]. СККМ рекрутируются в кровотоки [4] при активации рецептора CXCR4 и мигрируют в опухоль по градиенту концентрации фактора стромальных клеток 1α – (SDF)1α, высвобождаемого поврежденными тканями в зоне неоплазии. Повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) вследствие неопластического ангиогенеза и нейровоспаления создает условия для их накопления в опухоли и трансформации в клетки микроглии, секретирующего трансформирующий фактора роста β1, wnt3A- и wnt5A-лиганды и множество сигнальных молекул, повышающих содержание в клетках

ГБ β-катенина, усиливающих их пролиферативную активность и повышающих пластичность опухоли [5]. Лекарств и технологий, нарушающих взаимодействие клеток ГБ с микроокружением, не существует. Мы предположили, что одним из путей решения проблемы является применение ингибиторов сигнальной оси CXCR4/SDF1α, в частности [6], обратимого ингибитора CXCR4-рецептора – плериксафора (ПЛФ).

Цель исследования – на экспериментальной модели ГБ *in vivo* изучить влияние плериксафора на процессы миграции и хоуминга СККМ в опухолевый очаг и оценить их влияние на выживаемость экспериментальных животных.

Материалы и методы

Среда. Игла модифицированная Дульбеко (DMEM, № 21068028); антибиотик-антимикотик 100X (10000 уд. ед./мл пенициллин/стрептомицин, 25 мкг/мл фунгизон, № 15240096); эмбриональная сыворотка телят (FBS, № 16000044); трипсин, модифицированный

ЭДТА (0,25 % кат., № 25200056); натрий-фосфатный буфер (PBS 10X, № A1286301) – реагенты производства *Gibco* (США). Лекарственные субстанции: Г-КСФ (№ SRP3331), темозоломид (№ 85622-93-1), ПЛФ (№ 110078-46-1) – производства *Merck* (США).

Культура клеток глиомы линии С6 (CCL107™) производства компании *ATCC* (США). Характеристики культуры соответствуют паспортным параметрам и подтверждены сертификатами соответствия ISO 9001, ISO 13485, ISO/IEC 17025 и ISO 17034.

Экспериментальные животные. В работе использовано 160 аутбредных крыс породы Вистар массой 150–200 г. Эксперимент одобрен Этическим комитетом (протокол № 2 от 15.02.2024). Крыс содержали в условиях, соответствующих требованиям законодательства Российской Федерации и ключевым международным документам, регламентирующим работу с животными (Хельсинкская декларация WMA, директива ЕС 2010/63/EU, протоколы ARRIVE и AVMA от 2013 г.).

Культивирование клеток. Клетки культивировали в полной культуральной среде DMEM с добавлением 10 % FBS, 100 Ед/мл, антибиотика-антимикотика 100X при t 37 °С, 5 % CO₂, до достижения 80 % конfluenceности монослоя. Адгезировавшие клетки снимали с помощью ферментативной диссоциации (0,05 % trypsin-EDTA, 1:4 при 37 °С, 10 мин) и центрифугировали (120 g, 4 мин), ресуспендировали и после 3-го пассажа использовали в эксперименте.

Моделирование глиобластомы. Крыс наркотизировали путем в/б-введения 200 мкл смеси (тилетамин/золазепам 1:4 Virbac, Франция): 10⁶ клеток глиомы имплантировали в мозг шприцем Hamilton со скоростью 5 мкл/мин с помощью стереотаксического аппарата (*Narishige*, Япония) по координатам: Аp-1; Л 3,0; V 4,5, ТБС – 2,4 мм. Опухоль подтверждали через 10 дней методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) *Bruker's PharmaScan* (США).

Экспериментальная терапия. Сформировано четыре группы животных с глиомой С6, получивших ХЛТ: I – контрольная; II – ХЛТ + Г-КСФ; III – ХЛТ + ПЛФ; IV – ХЛТ + Г-

КСФ + ПЛФ. Животных облучали с помощью γ -терапевтической установки TrueBeam (*Varian Medical Systems*, США) в дозе 6 Гр, достигая за пять фракций общей суммарной дозы. Темозоломид (ТМЗ) вводили перорально 40 мг/кг массы тела по схеме: 3 дня – 2 дня перерыв – еще 4 дня введения препарата. Г-КСФ вводили внутривенно по 4 мкг/день на протяжении 4 дней. ПЛФ вводили п/к в дозе 0,24 мг/кг, ежедневно 7 суток.

Цитометрия. Пробирки для проточной цитометрии 10×75 мм (кат. № 2523749, производства *Beckman Coulter*, США) вносили по 50 мкл цельной гепарин-стабилизированной крови, образцы окрашивали препаратами антител, конъюгированных с различными флуорохромами (все антитела производства *Biolegend*, США). Для выявления основных субпопуляций лимфоцитов – с яркой (CD45bright) и сниженной (CD45dim) – периферической крови использовали антитела ghjnbcd CD45-APC/Cy7 (клон ОХ-1, кат. № 202216). Инкубацию клеток с антителами осуществляли при комнатной температуре в защищенном от света месте на протяжении 15 мин. По завершении инкубации в образцы вносили 250 мкл раствора для разрушения эритроцитов OptiLyse C (кат. № A11895, производства *Beckman Coulter*, США) при постоянном перемешивании. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (*Beckman Coulter*, США), оснащенном двумя диодными лазерами 488 и 638 нм. Для корректного исключения из зоны анализа клеток вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения клеток по малоугловому и боковому светорассеянию. Слиплись в ходе подготовки образцов клетки исключали при помощи гистограмм распределения клеток по интегральному и пиковому сигналам параметров малоуглового и бокового светорассеяния соответственно. Для каждого из образцов анализировали не менее 20 000 лимфоцитов, отвечающих указанным выше условиям. Математическую обработку данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.3 (*Beckman Coulter*, США).

Иммуноферментный анализ на содержание β -катенина (ab32572), wnt3A (ab219412), wnt5A (ab227229) и TGF β 1(ab215715) проводили с при-

менением наборов *Abcam* (США) по рекомендациям производителей. Оптическую плотность определяли на микропланшетном спектрофотометре BioRad xMark при $\lambda = 450$ нм. Результат вычисляли по калибровочной кривой и выражали в нг/мл.

Морфологическое исследование. Серийные срезы толщиной 7 мкм готовили на криостатном микротоме (MicromHM 560 Thermo). Окрашивали гематоксилин-эозином (*Sigma-Aldrich*, США) на 0,1 М ацетатном буфере pH 3,5 (FLUKA; 31048) по стандартной методике.

Иммуногистохимическое исследование выполнено с использованием первичных антител против PCNA (кат. № 14-9910-82, 1:2000) и IBA1 (кат. № MA5-27726, 1:500), по инструкции производителя – компании *Thermo* (США). Вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена PI-1000 (anti-rabbit); PI-2000 (anti-mouse). Для проведения иммунопероксидазной реакции использован хромоген NovaREDsubstratekit (Vector Laboratories SK-4800). Срезы заключали в балзам по стандартной методике. Препараты изучали с помощью микроскопа AxioScore A1 с объективом A-Plan 40X, 63X, 100X и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (*Carl Zeiss*, Германия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ GraphPad Prism 4.0 (*GraphPad Software, Inc*, США). В работе применяли U-тест Манна – Уитни для малых групп. Для проверки множественных сравнений использовали метод ANOVA. Результаты исследования представлены как (среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего) ($M \pm m$). Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки выживаемости экспериментальных животных строили кривую Каплана – Майера.

Результаты исследования

Имплантация клеток глиомы в мозг крыс сопровождалась быстрым развитием опухоли, которая при гистологическом исследовании на 7-й день эксперимента была представлена скоплением атипичных клеток разной формы и величины с формирующимся в центре кровеносными сосудами (рис. 1, а), в которых на 10–

14-м дне эксперимента появлялись признаки эластической мембраны (рис. 1, б). К 14-му дню отмечалась тенденция к уплотнению группировки клеток глиомы вокруг новообразованных сосудов (рис. 1, в) с появлением картины шаров или «псевдорозеол», отграниченных зонами разряжения и некроза (рис. 1, г). К 21-му дню наблюдений шаровидная группировка становилась менее плотной, утрачивала стройность очертаний, в опухоли начинали преобладать процессы гибели неопластических клеток, на что указывают обширные зоны некроза, содержащие множество запустевших микрососудов (рис. 1, д, е), отделяющих островковые скопления клеток глиомы от участков некроза. На периферии узел без четких границ переходил в дистрофически измененное вещество мозга, содержащее многочисленные солитарные клетки, формирующие сателлитные очаги, подобные языкам пламени (рис. 1, ж, з).

Указанная динамика морфологической картины позволяет утверждать, что имплантация опухолевых клеток линии С6 воспроизводит основные патофизиологические механизмы ГБ.

Стимуляция крыс Г-КСФ сопровождалась увеличением числа СККМ в крови экспериментальных животных в 24,4 раза, о чем свидетельствует рост количества элементов так называемой «боковой» популяции по *Telford* до $(39,9 \pm 1,2) \%$ по отношению к общему количеству таких элементов в контрольной группе (рис. 2, а, б). Плериксафор (ПЛФ) у животных группы III тоже увеличивал количество СККМ в крови (рис. 2, в), однако комбинация ПЛФ и Г-КСФ сопровождалась более выраженной мобилизацией стволовых клеток (рис. 2, г), количество которых возрастало в 32,9 раза, достигая соотношения $(52,7 \pm 1,8) \%$ (рис. 2, д) к общему числу иммуноцитов.

В отличие от крыс контрольной группы (рис. 3, а–д), у животных группы II опухолевый узел активно окрашивался антителами против PCNA (рис. 3, а, б), что, вероятно, было связано с интенсификацией процессов пролиферации под влиянием СККМ. Подобная картина отсутствовала у крыс группы III и IV, где введение Г-КСФ комбинировалось с применением плериксафора (рис. 3, в–д).

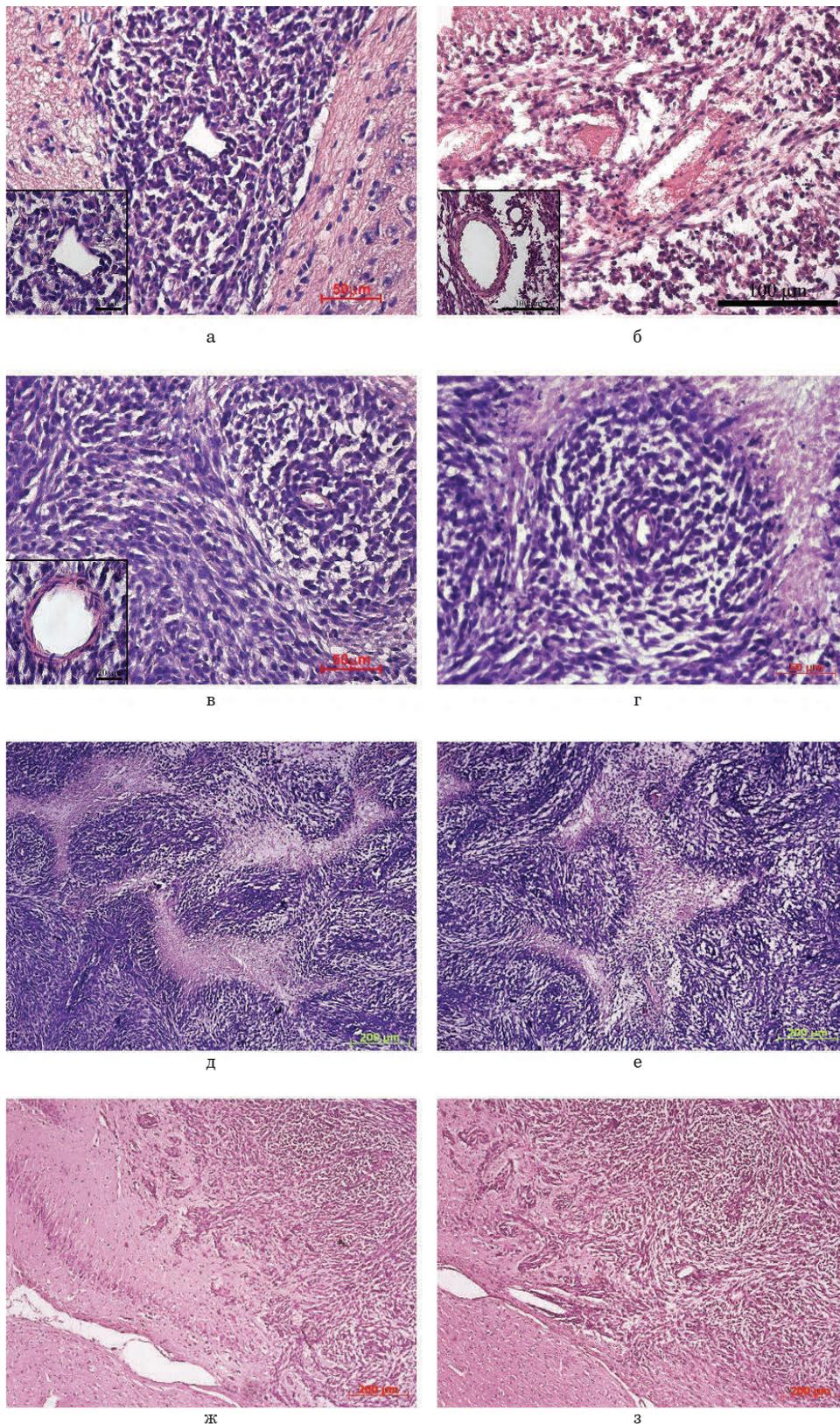


Рис. 1. Морфологическая характеристика опухолевой ткани в мозге экспериментальных животных. Центральная часть опухоли: *а, б* – 7-й день; *в, г* – 14-й день; *д, е* – 21-й день с момента имплантации клеток линии С6 в головной мозг. Край опухоли: *ж* – 14-й, *з* – 21-й день эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином

Fig. 1. Morphological characteristics of tumor tissue in the brain of experimental animals. Central part of the tumor: *a, b* – day 7; *в, г* – day 14; *д, е* – day 21 from the moment of implantation of C6 cells into the brain. Edge of the tumor: *ж* – day 14; *з* – day 21 of the experiment. Hematoxylin and eosin staining

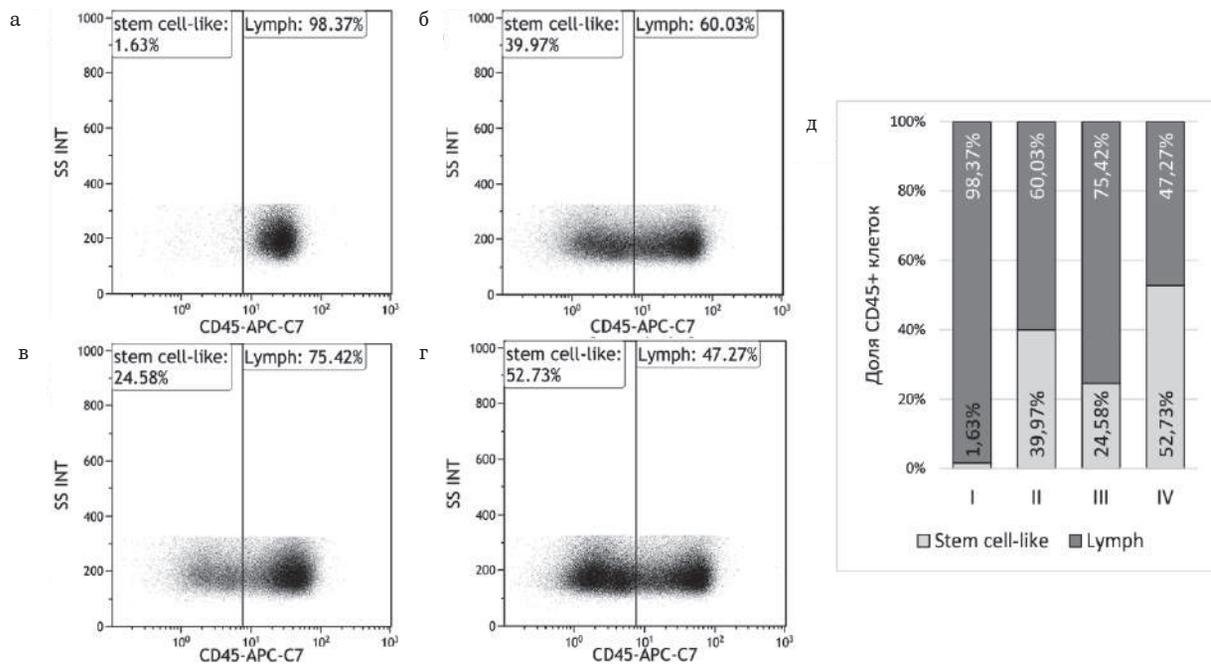


Рис. 2. Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови крыс с глиомой С6 на фоне стимуляции Г-КСФ после ХЛТ. По оси абсцисс – экспрессия общелейкоцитарного антигена CD45; по оси ординат – боковое светорассеяние. На основании экспрессии антигена CD45-лимфоциты периферической крови крысы разделены на две популяции – с яркой (CD45 bright, область «Lymph» содержит лимфоциты периферической крови) и сниженной (CD45dim, область «stem cell-like») экспрессией CD45, что позволяет рассматривать их в качестве стволовоподобных клеток, выход которых на периферию из костного мозга связан со стимуляцией: а – контрольная группа, получившая ХЛТ; б – группа ХЛТ + Г-КСФ; в – группа ХЛТ + ПЛФ; г – группа ХЛТ+Г-КСФ +ПЛФ

Fig. 2. Changes in the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in rats with C6 glioma against the background of G-CSF stimulation after CRT. The abscissa axis is the expression of the general leukocyte antigen CD45; the ordinate axis is lateral light scattering. Based on the expression of the CD45 antigen, rat peripheral blood lymphocytes are divided into two populations: with bright (CD45 bright, the “Lymph” region contains peripheral blood lymphocytes) and reduced (CD45dim, the “stem cell-like” region) expression of CD45, which allows us to consider them as stem-like cells, the exit of which to the periphery from the bone marrow is associated with stimulation: a – control group that received CRT; б – CRT + G-CSF group; в – CRT + PLX group; г – CRT + G-CSF + PLX group

Важным отличием опухолевой ткани у крыс контрольной группы (рис. 4, а, б) от животных группы II (рис. 4, в, г) было распределение элементов, иммунореактивных в отношении маркера IBA1 – маркера микроглии.

У животных контрольной группы в опухоли (рис. 4, а) и веществе мозга, прилегающем к неопластическому узлу (рис. 4, б), отмечались разрозненные скопления IBA1+-элементов; в то время как у крыс II группы отмечена плотная группировка микроглиоцитов в ткани опухоли, формирующих некое подобие демаркационной линии (рис. 4, в), и множественные скопления IBA+-клеток в перитуморальной зоне, характерная клаксообразная форма которых (рис. 4, г) может свидетельствовать об их высокой паракринной активности. Обогащение опухоли маркерами микроглии напрямую связано с миграцией и накоплением в опухоли СККМ, обусловленного стимулирующим дей-

ствием Г-КСФ, что подтверждается отсутствием подобной картины у крыс группы III, где редуцирующее действие плериксафора комбинируется с подавлением сигнализации CDF1α/CXCR4 (рис. 4, д, е). В пользу такого утверждения свидетельствуют и результаты, полученные в группе IV, где группировка IBA1+-клеток в области края опухоли (рис. 4, ж) была менее плотной, чем в группе II (рис. 4, д), при этом в переопухоловом пространстве выявлялись менее плотно сгруппированные элементы с маленьким телом и длинными отростками (рис. 4, з), что, вероятно, указывает на интенсивность процессов межклеточного взаимодействия в этой зоне.

Увеличение количества клеток микроглии в области опухолевого узла и прилегающей ткани мозга у крыс II группы (рис. 5, а) сопровождалось довольно значимыми изменениями содержания TGF-β1 (рис. 5, б) – (82,4±11,4) про-

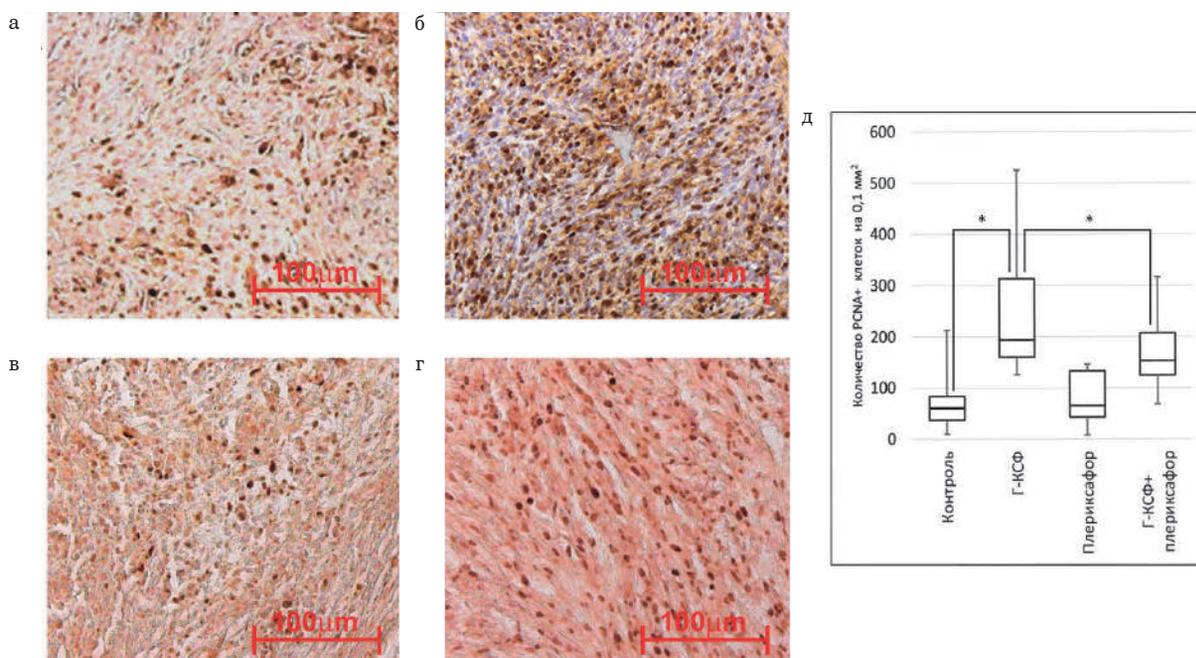


Рис. 3. Иммуноцитохимическая характеристика опухолевой ткани в мозге крыс с глиомой С6.

Окраска антителами против ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA, 30-е сутки):

a – контрольная группа, получившая ХЛТ; *б* – группа ХЛТ + Г-КСФ; *в* – группа ХЛТ + ПЛФ;

г – группа ХЛТ + Г-КСФ + ПЛФ; *д* – график «box plot» распределения PCNA+ -клеток в опухолевой ткани. «Ящик» отражает

медианное значение (центральная линия), а также 2-й и 3-й квартили; «усы» характеризуют минимальные и максимальные значения анализируемых величин; * – достоверность различий при $p < 0,05$

Fig. 3. Immunocytochemical characteristics of tumor tissue in the brain of rats with C6 glioma. Staining with antibodies against the proliferating cell nuclear antigen (PCNA, 30 days): *a* – control group that received CRT; *б* – CRT + G-CSF group; *в* – CRT + PLX group; *г* – CRT + G-CSF + PLX group; *д* – box plot of PCNA+ cell distribution in tumor tissue. “Box” is reflects the median value (central line), as well as 2nd and 3rd quartiles; “whiskers” are characterize the minimum and maximum values of the analyzed quantities; * – significance of differences at $p < 0.05$

тив ($38,8 \pm 16,3$) нг/мл в контроле. Однако особенно внимания заслуживают изменения в кластере молекул сигнального пути wnt (рис. 5, *в–д*). Наивысшее содержание белков wnt3A и wnt5A у крыс II группы – ($52,2 \pm 6,4$) и ($100 \pm 11,2$) нг/мл – обнаруживали значимые отличия от контроля – ($18,6 \pm 9,4$) и ($38,6 \pm 14,2$) нг/мл – и достоверно отличались от данных групп III и IV. Наивысшее содержание β -катенина, ключевого белка сигнального пути wnt, отмечено у крыс II группы – ($174 \pm 11,2$) против ($82,2 \pm 16,4$) нг/мл в контроле. Содержание β -катенина в ткани глиомы у крыс групп III и IV было ($94,2 \pm 4,7$) и ($110,8 \pm 14,6$) нг/мл (рис. 5, *д*).

Медиана выживаемости животных I группы (рис. 5, *е*), получавших только ХЛТ, составила ($35 \pm 9,9$) дня; животных II группы, получавших ХЛТ + Г-КСФ, – ($49 \pm 12,5$) дня; крыс III группы, получавших ХЛТ + ПЛФ, – ($51 \pm 10,8$) дня; крыс, получивших ХЛТ + Г-КСФ + ПЛФ, – ($64 \pm 13,2$) дня.

Обсуждение

В работах 2016–2020 гг. нашим коллективом показана способность СККМ мигрировать в ткань ГБ [7], установлена прямая связь между их накоплением в опухоли и обогащением популяции микроглии [8], предложены способы провоспалительной модификации микроокружения опухолевых клеток [9]. Результаты данного эксперимента не только расширяют наши представления о физиологии СККМ, но и показывают, что они непосредственно вовлечены в патогенез ГБ, что нельзя не учитывать при проведении лечения. Как известно, микроглия [10] способна к секреции ряда факторов пролиферации, что и было показано в исследовании, в этой связи использование в клинической практике Г-КСФ для преодоления миелосупрессии, вызванной химиолучевой терапией, может играть довольно негативную роль в формировании рецидива. В пользу именно такой логики процесса указывает отсутствие

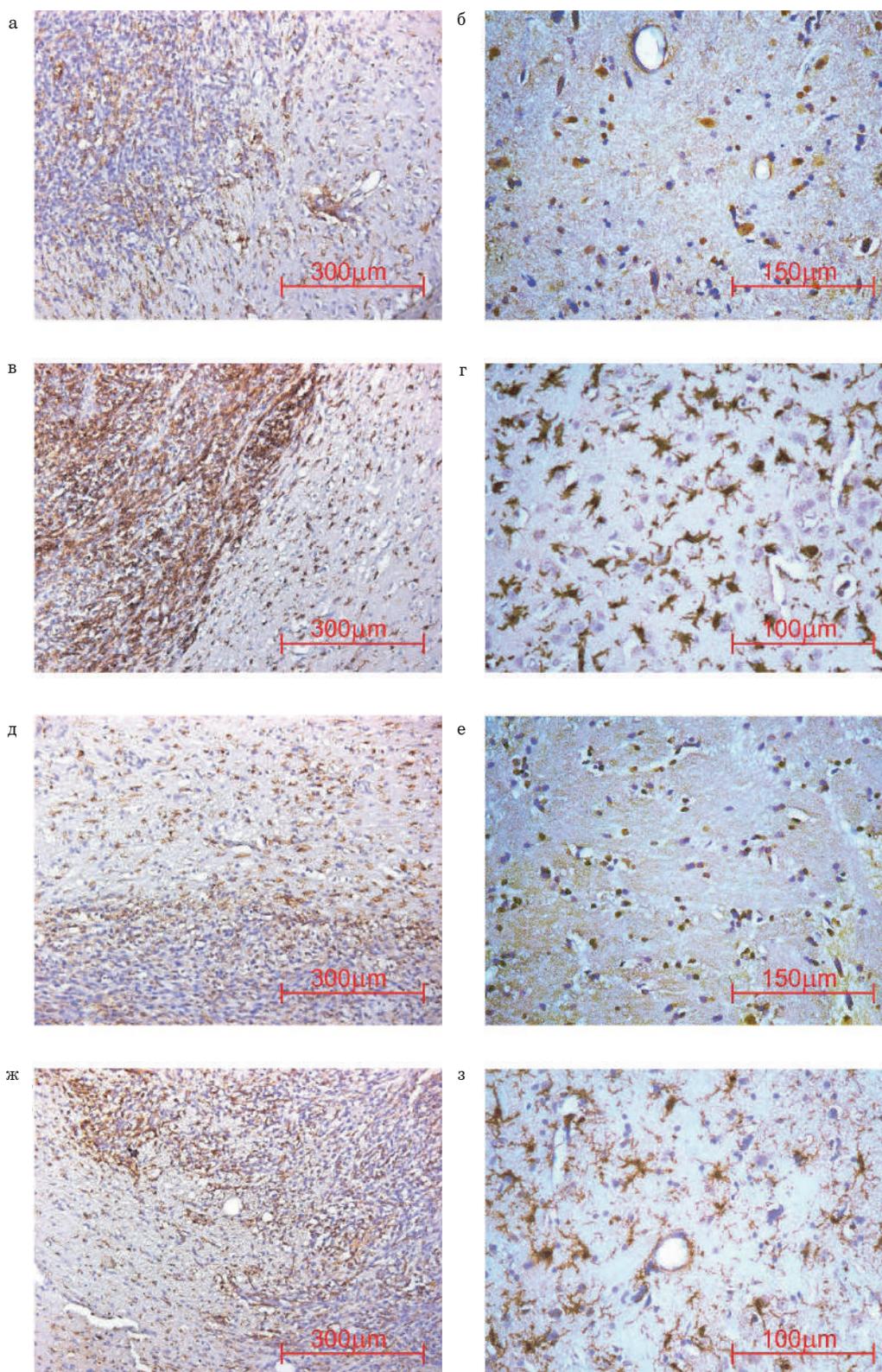


Рис. 4 Иммуноцитохимическая характеристика опухолевой ткани в мозге крыс с глиомой С6. Окраска антителами против ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 – маркера микроглии/макрофагов (IBA1+, 30-е сутки).

Левая колонка – зона на границе опухолевого узла; правая колонка – перитуморальное пространство, 5 мкм от края опухоли: а, б – контрольная группа, получившая ХЛТ; в, г – группа ХЛТ + Г-КСФ; д, е – группа ХЛТ + ПЛФ; ж, з – группа ХЛТ + Г-КСФ + ПЛФ

Fig. 4. Immunocytochemical characteristics of tumor tissue in the brain of rats with C6 glioma. Staining with antibodies against ionized calcium-binding adapter molecule 1, a marker of microglia/macrophages (IBA1+, day 30). Left column is zone at the border of the tumor node, Right column is peritumor space, 5 μm from the edge of the tumor: а, б – control group that received CRT; в, г – CRT + G-CSF group; д, е – CRT + PLX group; ж, з – CRT + G-CSF + PLX group

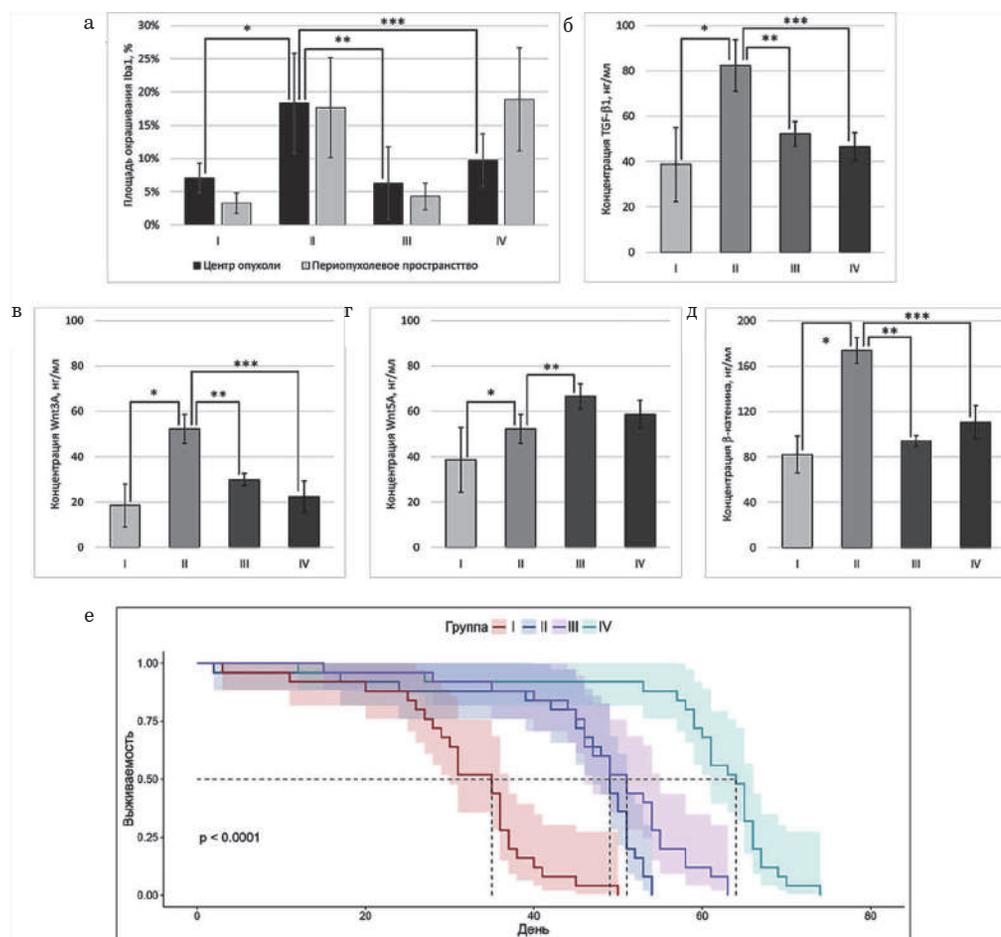


Рис. 5. Ключевые параметры животных с глиомой С6, использованных в эксперименте: *а* – отношение площади окрашивания антителами против IBA+–ткани опухоли и перитуморального пространства к общей площади препарата; *б–д* – результаты иммуноферментного анализа вещества мозга в отношении TGFβ1 (*б*); Wnt3A (*в*); Wnt 5A (*г*); β-катенина (нг/мл) (*д*). Результаты представлены как (среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего) ($M \pm m$); *, **, *** – достоверность различий при $p < 0,05$; *е* – кривая выживаемости экспериментальных животных по Каплану – Майеру **Fig. 5.** Key parameters of animals with C6 glioma used in the experiment: *a* – the ratio of the area of staining with antibodies against IBA+ of tumor tissue and peritumor space to the total area of the preparation; *б–д* – the results of enzyme immunoassay of brain matter in relation to TGFβ1 (*б*); Wnt3A (*в*); Wnt 5A (*г*); β-catenin (ng/ml) (*д*). The results are presented as the arithmetic mean ± standard error of the mean ($M \pm m$); *, **, *** – the reliability of differences at $p < 0.05$; *e* – survival curve of experimental animals according to Kaplan – Meier

подобных признаков в контроле и в группах III и IV, где используется плериксафор.

Плериксафор показал хорошую переносимость в ходе предшествующих клинических испытаний у больных ГБ [11], но его способность блокировать связь CXCR4-рецептора мембраны СККМ с его лигандом SDF-1α позволяет переосмыслить подходы к использованию данного препарата. Как следует из эксперимента, плериксафор увеличивает число циркулирующих СККМ в кровеносном русле, что является результатом нарушения связи между CXCR4 и его лигандом [12]. При этом СККМ не накапливаются в опухоли, что позволяет «выключить» один из важнейших механизмов неопластического процесса,

ведущий к усилению содержания в опухолевых клетках β-катенина. На обоснованность такого утверждения указывает небольшое, но достоверное увеличение выживаемости животных, получавших плериксафор в комбинации с Г-КСФ, причем высокая концентрация СККМ и иммунцитов в кровотоке животных открывает хорошие перспективы для иммунотерапии.

Заключение

Плериксафор усиливает рекрутирующее действие Г-КСФ на СККМ, нарушает процессы их миграции и хоуминга в неопластический очаг, что сопровождается уменьшением числа пролиферирующих клеток и элементов ми-

кросли, снижением содержания TGF β 1, wnt-лигандов и β -катенина в веществе мозга и увеличением выживаемости экспериментальных животных с глиомой С6.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. **Financing.** The study was performed without external funding.

Литература / References

1. Roda D., Veiga P., Melo J. B., Carreira I. M., Ribeiro I. P. Principles in the Management of Glioblastoma. *Genes* (Basel). 2024;15(4):501. Doi: 10.3390/genes15040501. EDN: HHJNDX.
2. Sloan A. R., Silver D. J., Kint S., Gallo M., Lathia J. D. Cancer stem cell hypothesis 2.0 in glioblastoma: Where are we now and where are we going? *Neuro-Oncology*. 2024;26(5):785–795. Doi: 10.1093/neuonc/noae011. EDN: WUOBFQ.
3. Read R. D., Tapp Z. M., Rajappa P., Hambardzumyan D. Glioblastoma microenvironment-from biology to therapy. *Genes and Development*. 2024;38(9–10):360–379. Doi: 10.1101/gad.351427.123.
4. Cancilla D., Rettig M. P., Karpova D. et al. Targeting CXCR4, VLA-4, and CXCR2 for hematopoietic stem cell mobilization. *Blood Advances*. 2024;8(6):1379–1383. Doi: 10.1182/bloodadvances.2023011653. EDN: NZJUJQ.
5. Friedmann-Morvinski D., Hambardzumyan D. Monocyte-neutrophil entanglement in glioblastoma. *Journal of Clinical Investigation*. 2023;133(1):e163451. Doi: 10.1172/JCI163451. EDN: PSXSQE
6. Mullard A. CXCR4 chemokine antagonist scores a first FDA approval for WHIM syndrome. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2024;23(6):411. Doi: 10.1038/d41573-024-00083-7.
7. Bryukhovetskiy I. S., Dyuzhen I. V., Shevchenko V. E. et al. Hematopoietic stem cells as a tool for the treatment of glioblastoma multiforme. *Molecular Medicine Reports*. 2016;14(5):4511–4520. Doi: 10.3892/mmr.2016.5852. EDN: XFBQEP.
8. Bryukhovetskiy I., Manzhulo I., Mischenko P. et al. Cancer stem cells and microglia in the processes of glioblastoma multiforme invasive growth. *Oncology Letters*. 2016;12(3):1721–1728. Doi: 10.3892/ol.2016.4886. EDN: WVEKMF.
9. Zaitsev S., Sharma H. S., Sharma A. et al. Pro-inflammatory modification of cancer cells microsurroundings increases the survival rates for rats with low differentiated malignant glioma of brain. *International Review of Neurobiology*. 2020;(151):253–279. Doi: 10.1016/bs.irn.2020.03.027. EDN: BBRNQG.
10. Fan D., Yue Q., Chen J. et al. Reprogramming the immunosuppressive microenvironment of IDH1 wild-type glioblastoma by blocking Wnt signaling between microglia and cancer cells. *Oncoimmunology*. 2021;10(1):1932061. Doi: 10.1080/2162402X.2021.1932061.
11. Brown J. M., Thomas R., Nagpal S., Recht L. Macrophage exclusion after radiation therapy (MERT): A new and effective way to increase the therapeutic ratio of radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*. 2020; 144:159–164. Doi: 10.1016/j.radonc.2019.11.020.
12. Arcangeli M. L., Brault P., Bourhis J. H. et al. Combined G-CSF and Plerixafor enhance hematopoietic recovery of CD34(+) cells from poor mobilizer patients in NSG mice. *Experimental Hematology*. 2020;(86):15–20.e2. Doi: 10.1016/j.exphem.2020.05.006.

Сведения об авторах

Олег Игоревич Пак – кандидат медицинских наук, доцент Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета (г. Владивосток, Россия);
Александра Асадовна Косьянова – кандидат биологических наук, старший преподаватель Департамента фармациии и фармакологии Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета (г. Владивосток, Россия);
Сергей Викторович Зайцев – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной и кле-

точной нейробиологии, доцент Департамента фармациии и фармакологии Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета (г. Владивосток, Россия);

Игорь Степанович Брюховецкий – доктор медицинских наук, доцент, научный руководитель Медицинского комплекса, профессор Департамента фармациии и фармакологии Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета (г. Владивосток, Россия).

Information about the authors

Oleg I. Pak – Cand. of Sci. (Med.), Associate Professor at the School of Medicine and Lifescience, Far Eastern Federal University (Vladivostok, Russia);
Aleksandra A. Kosianova – Cand. of Sci. (Biol.), Senior Lecturer at the Department of Pharmacy and Pharmacology, School of Medicine and Lifescience, Far Eastern Federal University (Vladivostok, Russia);
Sergei V. Zaitsev – Cand. of Sci. (Biol.), Head at the Laboratory of the Molecular and Cellular Neurobiology, Associate

Professor at the Department of Pharmacy and Pharmacology, School of Medicine and Lifescience, Far Eastern Federal University (Vladivostok, Russia);

Igor S. Bryukhovetskiy – Dr. of Sci. (Med.), Associate Professor, Science Director at the Medical Complex, Professor at the Department of Pharmacy and Pharmacology, School of Medicine and Lifescience, Far Eastern Federal University (Vladivostok, Russia).

Принята к публикации 26.08.2024

Accepted 26.08.2024