

- V. Bubanovic// Medical Hypotheses. – 2003. – Vol. 60, №3. – P. 315–320.
29. Gossens K. Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25/ K.Gossens, S.Naus, S.Y.Corbil, S.Lin, F.M.Rossi, J.Kast, H.J.Ziltener// J. Exp Med.– 2009. – Vol.206, №4. – P. 761-778.
30. Фуллер Б. Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих/Б.Фуллер, К.Грин, В.И. Грищенко//Пробл. Кробиологии. – 2004. – № 3. – С. 58-71.
31. Быковская С.Н. Роль дефектов иммуносупрессии в развитии аутоиммунных заболеваний/ С.Н.Быковская, Е.Л.Насонов// Научн. практ. ревматол. – 2005. – №4. – С. 81-84.

## РЕЗЮМЕ

### РОЛЬ НАТУРАЛЬНИХ Т-РЕГУЛЯТОРНИХ КЛІТИН В ПАТОГЕНЕЗІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛИТУ І МОЖЛИВІ ШЛЯХИ КОРЕКЦІЇ ЦЬОЇ ПАТОЛОГІЇ КРИОКОНСЕРВІРОВАННИМИ ФЕТАЛЬНИМИ НЕРВОВИМИ КЛІТИНАМИ

Гольцев А.Н., Порожан Е.А., Останків М.В., Діброва Т.Г., Бабенко Н.Н., Гаєвська Ю.А., Бондарович Н.А.

Інститут проблем кробиології і криомедицини НАН України, Україна, г.Харків, вул.Переяславська, 23

В роботі проведена оцінка вмісту клітин з фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (nTreg) в тимусі і CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> (iTreg) у периферичній крові щурів при розвитку нейродегенеративного захворювання аутоімунної природи – експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ), аналога розсіяного склерозу. Показано збільшення кількості nTreg клітин в тимусі і зниження Treg клітин у

периферичній крові тварин з ЕАЕ. Встановлено односпрямована динаміка зміни кількості Treg і дендритних клітин (ДК) тимуса. Показано, що застосування криоконсервованих фетальних нервових клітин (кФНК) знижувало підвищений при патології вміст у тимусі як CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, так і ДК, нормалізуючи дані показники до кінця 3-го тижня, що призводило до збільшення кількості Treg клітин на периферії і супроводжувалося мінімізацією клінічних проявів ЕАЕ.

## SUMMARY

### THE ROLE OF NATURAL T-REGULATORY CELLS IN THE PATHOGENESIS OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS AND POSSIBLE WAYS TO CORRECT THE PATHOLOGY WITH CRYOPRESERVED FETAL NEURAL CELLS

Porozhan Ye.A., Goltsev A.N., Ostankov M. V., Dubrava T.G., Babenko N.N., Gayevskaya Yu.A., Bondarovich N.A.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

In this paper we evaluated the content of cells with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> phenotype (nTreg) in the thymus and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> cells (iTreg) in the peripheral blood of rats during the development of neurodegenerative disease of autoimmune nature – experimental allergic encephalomyelitis (EAE), an analogue of multiple sclerosis. An increase in number of nTreg cells in the thymus and decrease in Treg cells in the peripheral blood of animals with EAE has been shown. Unidirectional evolution of Treg and dendritic cell (DC) content in the thymus has been established. It has been shown that application of cryopreserved fetal neural cells (cFNC) reduced the increased pathological content in the thymus of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and DC with normalization of these parameters by the end of the third week which led to the restoration of the export function of the thymus, to an increase in the number of Treg cells on the periphery, and was accompanied by minimization of EAE clinical manifestation.

УДК:576.3/.4:616-006.484:616.15:616.831-006.484

### ОСОБЛИВОСТІ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ГАЛАВІТУ НА КЛІТИНИ ГЛІОМ ТА МОНО-НУКЛЕАРИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ З ГЛІОМАМИ IN VITRO

ЛЮБИЧ Л.Д., ЛІСЯНИЙ М.І., СЕМЕНОВА В.М., ГЛАВАЦЬКИЙ О.Я., ЛІСЯНИЙ О.М., СТАЙНО Л.П.

ДУ «Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України»

Лікування хворих із злоякісними гліомами головного мозку залишається однією з невирішених і актуальних проблем сучасної нейроонкології. Одним з напрямків, що активно розробляється для оптимізації лікування цих хворих, є пошук препаратів, спрямованих на стимуляцію протипухлинного імунітету та гальмування проліферації пухлин. До таких препаратів відносять лікарський засіб галавіт (5-аміно-1,2,3,4-тетрагідрофалазин-1,4- дієнонатрієва сіль), дозволений для клінічного застосування нака-

зом МЗ РФ від 31.03.1997 р. як протизапальний та імуномодуючий препарат, який використовується у загальній онкології [1,2] та при інфекційно-запальних процесах [3-5].

Встановлено, що галавіт впливає на проліферативну функцію Т- і В-лімфоцитів, антитілогенез, цитотоксичну активність природних кілерів та фагоцитарну активність нейтрофілів периферичної крові, практично не впливає на нормально функціонуючі клітини, але пригнічує гіперактивовані клітини [1]. Препарат зворотно інгібує

синтез макрофагами прозапальних цитокінів, відновлює фагоцитарну активність макрофагів і нейтрофілів та антигенпрезентуючу функцію макрофагів, активує репаративні процеси [1,6]. Галавіт гальмував ріст і метастазування злоякісних новоутворень, зокрема експериментальної карциноми Льюїса, стримував прогресування дисплазії та міоми матки у жінок репродуктивного віку, утворення фіброзних поліпів ендометрію у жінок та гіперплазію передміхурової залози [1,6-8]. Відзначено значний позитивний вплив галавіту на ефективність хіміотерапії у хворих на рак молочної залози та легень [2,6].

Відносно злоякісних гліом головного мозку попередніми дослідженнями встановлено, що галавіт може чинити як пряму цитодеструктивну і антипроліферативну, так і опосередковану дію на клітини цих новоутворень [9,10].

Метою даної роботи є продовження поглибленого вивчення механізмів впливу галавіту на клітини гліом в суспензійних та довгострокових дисоційованих культурах, а також на мононуклеари периферичної крові (МНПК) хворих з гліомами *in vitro*.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження слугували: а) фрагменти пухлин головного мозку, отримані під час оперативного втручання (n=17)); б) МНПК хворих з гліомами головного мозку (n=17). При гістологічному дослідженні пухлин на біоптичному матеріалі діагностовано 7 анапластичних астроцитом (III ступінь злоякісності) та 10 гліобластом (IV ступінь анаплазії) згідно Міжнародної гістологічної класифікації пухлин ЦНС [11]. Клітинну суспензію отримували з подрібнених фрагментів пухлини шляхом механічної дисоціації піпетуванням пухлинних фрагментів з наступним відмиванням (двічі) забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) рН 7,2-7,4. МНПК виділяли центрифугуванням зразків периферичної крові у градієнті фікол-верографіну (d=1,077) при 1500 об/хв протягом 30 хв з наступним відмиванням (двічі) ЗФР рН 7,2-7,4. Життєздатність клітин визначали за виключенням 0,2% трипанового синього ("Merck", Німеччина) у стандартному цитотоксичному тесті [12].

З метою вивчення впливу галавіту на пухлинні клітини гліом та МНПК в суспензійних культурах галавіт (ЗАО «ЦСМ «МЕДИКОР», Москва, Росія) у концентраціях 0,02 та 0,10 мг/мл додавали до суспензії свіжовиділених клітин із зразків пухлини або периферичної крові та інкубували протягом 24 год. Вибір такого діапазону концентрацій ґрунтувався на даних попередніх досліджень, якими було встановлено цитотоксичний ефект галавіту стосовно зразків пухлин головного мозку в концентрації 0,05 мг/мл [10], та з урахуванням даних літератури щодо імуномо-

дулюючих властивостей препарату (відсутність мітогенного ефекту у концентраціях 0,05 – 12,5 мг/мл, стимуляція проліферативної активності лімфоцитів у концентраціях 0,025 – 0,050 мг/мл, стимуляція поглинальної здатності нейтрофілів у концентраціях 0,002 – 0,020 мг/мл, стимуляція цитотоксичної функції природних кілерів у концентраціях 0,025 – 0,010 мг/мл) [1].

Після інкубації з галавітом в суспензіях визначали кількість життєздатних клітин, рівень експресії маркерів фенотипу (PI, CD-25,-95,-54,-56,-A,B,C,-DR), а також різницю показників до та після інкубації клітин з препаратом ( $\Delta$  життєздатності, %;  $\Delta$  PI<sup>+</sup> клітин, %;  $\Delta$ CD<sup>+</sup>, %). Цитотоксичний вплив галавіту на пухлинні клітини гліом оцінювали шляхом підрахунку в камері Горяєва життєздатних клітин до і після інкубації з препаратом з визначенням цитотоксичного індексу (ЦІ) за формулою [13]:

$$\text{ЦІ} = \frac{\text{ЖКп} - \text{ЖКп} + \Gamma}{\text{ЖКп}} \times 100 \%,$$

де ЖКп – кількість життєздатних клітин у початковій суспензії;

ЖКп+Г – кількість жит. клітин у суспензії після інкубації з галавітом.

Визначення вмісту апоптичних клітин здійснювали цитофлуориметричним методом за допомогою пропідіума йодиду (PI) в концентрації 0,05 мг/мл згідно рекомендацій [14].

Експресію антигенів CD25 (рецептор  $\alpha$ -ланцюга IL-2), CD-95 (FAS-рецептор), CD-54 (молекула адгезії ICAM), CD-56 (молекула нейрональної адгезії NCAM), HLA-A,B,C (антигени гістосумісності I класу) та HLA-DR (антиген гістосумісності II класу) визначали за допомогою імунофенотипування непрямим імунофлюоресцентним методом за загальноприйнятою методикою [14] на проточному імуноцитофлуориметрі (FACS Calibur, BD, США).

Особливості прямої дії галавіту на цитоструктуру пухлинних клітин гліобластоми досліджували також в дисоційованих довгострокових культурах, отриманих за стандартною методикою [12]. Для цього фрагменти пухлин, видалених на операції, ретельно відмивали від крові, звільняли від судин та оболонок, подрібнювали мікроножицями у середовищі DMEM, проводили механічну дисоціацію багаторазовим піпетуванням пухлинних фрагментів. Клітини в кількості  $1 \times 10^6$  наносили на покривні адгезивні скельця, попередньо оброблені поліетиленіміном. Культивування клітин пухлин проводили в чашках Петрі в середовищі 199 та DMEM (1:1) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки, 400 мг % глюкози та 0,2 од/мл інсуліну. Культури пухлин утримували в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора (37°C, 95% вологості та 5% CO<sub>2</sub>), прижиттєво спостерігали в динаміці росту

в інвертованому мікроскопі Біолам П-3 (ЛОМО, С.-Петербург). Після отримання поширеної зони росту культури інкубували з галавітом в концентраціях 0,02 та 0,10 мг/мл протягом 24 та 48 год. В порівняльному аспекті в дослідних та контрольних культурах аналізували загальну архітектуру зони росту культур, фенотипові особливості пухлинних клітин, мітотичну активність, а також вміст клітин в стані дистрофії та некробіозу. Загальна тривалість культивування гліобластом складала 16 діб. Для гістологічного дослідження в різні строки спостереження культури фіксували в 10% формаліні, фарбували гематоксиліном Караччі.

Отримані гістологічні препарати аналізували на цитоаналізаторі зображення Ibas-2000 з наступною фотореєстрацією (Німеччина).

**РЕЗУЛЬТАТИ**

*Вивчення впливу галавіту на суспензійні культури клітин пухлин головного мозку людини.* При дослідженні біоптатів пухлин в суспензійних культурах, інкубованих з галавітом, встановлено цитотоксичний вплив препарату в обох концентраціях в середньому стосовно 70-80% зразків пухлин (табл.1). Частка зразків, в яких ЦІ дії галавіту становив 50% і вище, складала 41,2%.

**Таблиця 1**

**Оцінка впливу галавіту на клітини гліом головного мозку людини**

Гістологічний тип гліом	Концентрація препарату, мг/мл	ЦІ, %				
		Середній показник (M+m)	% зразків з цитотоксичним ефектом	(M+m) зразків з цитотоксичним ефектом	% зразків з ЦІ50%	% зразків з відсутністю ефекту
Гліоми (n=17)	0,02	28,34+13,26	70,6	50,61+19,44	41,2	29,4
	0,10	31,39+34,83	82,4	53,08+16,64	41,2	17,6
астроцитоми III ступеня анаплазії (n=7)	0,02	22,99+13,10	71,4	62,50+6,80	28,6	28,6
	0,10	62,50+6,80 *1	100,0	66,20+13,10	100,0	0,0
Гліобластоми (IV ступінь анаплазії) (n=10)	0,02	10,65+34,00	70,0	43,65+16,28	30,0	30,0
	0,10	28,75+13,60 *1	70,0	58,85+16,92	50,0	30,0

Примітка: \*<sub>1</sub> - достовірність різниці між групами (p<0,04).

При цьому значними виявилися індивідуальні відмінності у досліджених зразках: розмах коливань ЦІ становив (13,3 – 100)%. Виразного дозозалежного ефекту нами не встановлено: середні значення ЦІ галавіту при дії препарату в концентраціях 0,02 та 0,10 мг/мл становили (50,61+19,44)% та (53,08+16,64)% відповідно. Поряд з цим на частину зразків галавіт не чинив цитотоксичної дії: частка суспензійних культур клітин гліом з відсутністю ефекту складала 29,4% при тестуванні концентрації препарату 0,02 мг/мл та 17,6% – при 0,10 мг/мл відповідно.

Порівняльний аналіз цитотоксичного впливу галавіту на суспензійні культури гліом різного ступеня анаплазії показав більшу чутливість до препарату клітин гліом III ступеня анаплазії у порівнянні з клітинами гліобластом (IV ступінь анаплазії). Зокрема, середній показник цитотоксичності галавіту в концентрації 0,10 мг/мл в суспензійних культурах анапластичних астроцитом III ступеня анаплазії достовірно перевищував (p<0,04) ЦІ в культурах гліобластом (табл.1). При цьому препарат виявляв цитотоксичний вплив на всі зразки (100%) анапластичних астроцитом (ЦІ перевищував 50%) на відміну

від зразків гліобластом, в яких 50% цитотоксична дія галавіту зареєстрована лише у половини зразків. 30% досліджених суспензійних культур гліобластом виявились нечутливими до впливу галавіту в обох концентраціях.

При збільшенні концентрації галавіту у суспензійних культурах як астроцитом III ступеня анаплазії, так і гліобластом зростає ЦІ препарату, а також відсоток зразків з ЦІ50%; тобто прослідковувалась тенденція до залежності цитотоксичної дії галавіту від концентрації препарату.

При дослідженні впливу галавіту на експресію CD25, -54, -56, HLA-A, B, C та HLA-DR методом імунофенотипування пухлинних клітин встановлено, що галавіт підвищував кількість CD25+, CD56+ (0,02 мг/мл) та HLA-ABC+ (0,10 мг/мл) клітин у суспензійних культурах гліом (табл.2). Під впливом галавіту відбувалось підвищення частки CD25+, CD56+ (0,02 мг/мл) та HLA-ABC+ (0,10 мг/мл) клітин у суспензійних культурах гліом III ступеня анаплазії та підвищення частки CD25+, CD54+ (0,02 мг/мл), HLA-ABC+ (0,02 мг/мл) та HLA-DR+ (0,02 мг/мл) клітин у суспензійних культурах гліобластом (табл.2).

Таблиця 2

Оцінка впливу галавіту на експресію антигенів клітинами гліом головного мозку людини

Гістологічний тип гліом	Концентрація препарату, мг/мл	CD25+ Δ, %	CD54+ Δ, %	CD56+ Δ, %	HLA-ABC+ Δ, %	HLA-DR+ Δ, %
Гліоми (n=17)	0,02	3,05+2,10	1,53+1,71	2,37+2,79	1,33+1,12	1,45+2,46
	0,10	3,40+2,07	1,39+1,93	0,59+2,42	2,07+1,09	1,43+1,41
Астроцитоми III ступеня анаплазії (n=7)	0,02	2,27+1,02	0,23+1,42	3,23+3,78	0,55+0,97	0,70+1,60
	0,10	3,30+1,22	1,13+0,77	1,75+1,10	2,45+0,83	1,28+1,41
Гліобластоми (IV ступінь анаплазії) (n=10)	0,02	3,83+2,38	3,28+1,68	1,23+0,48	2,90+1,12	2,20+2,12
	0,10	3,50+2,15	1,73+1,57	-0,97+2,13	1,30+1,09	1,63+0,88

За результатами наших досліджень, галавіт в обох досліджених концентраціях демонстрував тенденцію до проапоптичного впливу: у присутності препарату кількість PI+ клітин в суспензійних культурах злоякісних гліом зростала в середньому на 5% (табл.3). Аналіз показників в залежності від гістологічного типу гліом виявив, що суспензії свіжовиділених клітин анапластичних астроцитом містили меншу кількість PI+ клітин, ніж суспензії гліобластом, однак більшу кількість CD95+клітин – клітин, що несуть FAS-рецептор, експресія якого відобра-

жає готовність клітин до апоптозу. Під впливом галавіту у суспензійних культурах анапластичних астроцитом достовірно зростала кількість PI+ клітин (p<0,024 та p<0,038 відповідно при дії концентрацій препарату 0,02 і 0,10 мг/мл), приріст PI+клітин у культурах сягав 12-16%; тоді як кількість CD95+клітин зменшувалась (на 3-4%). На відміну від астроцитом III ступеня анаплазії, у суспензійних культурах гліобластом під дією галавіту, навпаки, дещо зменшувалась кількість PI+клітин (на 2-8%) та зростала частка CD95+клітин (на 2-3,5%).

Таблиця 3

Оцінка впливу галавіту на рівень апоптозу в пухлинних клітинах у хворих з гліомами різного ступеня анаплазії, %

Гістологічний тип гліом	Концентрація препарату, мг/мл	PI+			CD95+		
		початковий показник	+ галавіт	Δ, %	початковий показник	+ галавіт	Δ, %
Гліоми (n=17)	0,02 мг	24,71+11,28	29,88+7,27	5,16+11,20	10,61+4,50	9,70+1,64	-0,91+4,33
	0,10 мг		32,17+8,57	5,77+12,60		10,97+1,70	-0,09+5,66
Астроцитоми III ступеня анаплазії (n=7)	0,02 мг	20,83+4,46	33,58+5,06&	12,75+9,52	13,98+6,05	10,03+1,90	-3,95+5,54
	0,10 мг		37,05+9,50&	16,23+9,91		11,18+1,62	-2,80+9,67
Гліобластоми (IV ступінь анаплазії) (n=10)	0,02 мг	28,60+17,40	26,18+7,82	-2,43+12,11	7,25+1,60	9,38+1,06	2,13+2,25
	0,10 мг		25,67+6,12	-8,17+13,02		10,70+1,05	3,53+2,47

Примітка: & - достовірність різниці у порівнянні з початковим показником (p<0,05).

Вивчення впливу галавіту на суспензійні культури МНПК хворих з пухлинами головного мозку людини. Встановлено достовірну кількісну відмінність впливу галавіту в концентраціях 0,02 і 0,10 мг/мл на життєздатність мононуклеарів хворих (p<0,02), а також виявлено різницю цитотоксичного впливу тестованих концентрацій препарату на МНПК (p<0,03). При цьому спостерігалась тенденція до дозозалежного ефек-

ту: виявлено цитотоксичний вплив препарату в концентрації 0,02 мг/мл в середньому у 58% зразків, а концентрації 0,10 мг/мл – у 88% зразків (табл.4). Частка зразків, в яких ЦІ дії галавіту становив 50% і вище, складала 11,8%. Середнє значення ЦІ галавіту при дії препарату в концентрації 0,02 мг/мл становило (-0,89±10,23)%, 0,10 мг/мл – (40,27±15,39)%. Поряд з цим, на частину зразків галавіт не чинив цитотоксичної

дії: частка суспензійних культур МНПК хворих з гліомами з відсутністю ефекту складала 41,2% при дії концентрації препарату 0,02 мг/мл та 11,8% - при 0,10 мг/мл відповідно.

Порівняльний аналіз цитотоксичного впливу галавіту на суспензійні культури МНПК хворих з гліомами різного ступеня анаплазії показав більшу чутливість до впливу галавіту у МНПК хворих з гліобластомами (IV ступінь анаплазії), ніж у хворих з гліомами III ступеня анаплазії. Зокрема, середні показники цитотоксичності галавіту в обох концентраціях в суспензійних культурах МНПК хворих з гліобластомами перевищували ЦІ в культурах МНПК хворих з анапластичними астроцитомами (табл.4). При цьо-

му у концентрації 0,02 мг/мл препарат виявив цитотоксичний вплив на 28,6% зразків МНПК хворих з анапластичними астроцитомами (ЦІ не досягав 50%, а на 71,4% зразків не виявив цитотоксичної дії). На відміну від цього, у хворих з гліобластомами на 80% зразків МНПК препарат вплинув цитотоксично, а 50%-цитотоксична дія галавіту зареєстрована у 30% зразків. При збільшенні концентрації галавіту до 0,10 мг/мл частка зразків МНПК хворих з анапластичними астроцитомами, стосовно яких галавіт чинив цитотоксичну дію, зросла до 71,4%, тоді як ця концентрація галавіту цитотоксично впливала на 100% зразків МНПК хворих з гліобластомами.

Таблиця 4

Оцінка впливу галавіту на МНПК хворих з гліомами головного мозку

Гістологічний тип пухлини	Концентрація препарату, мг/мл	Δ життєздатності, %	ЦІ, %			
			Середній показник (M+m)	% зразків з цитотоксичним ефектом	% зразків з ЦІ 50%	% зразків з відсутністю ефекту
Гліоми (n=17)	0,20	8,32+10,58 *1	-0,89+10,23 *2	58,8	11,8	41,2
	0,10	-14,42+31,01 *1	40,27+15,39 *2	88,2	11,8	11,8
астроцитоми III ступеня анаплазії (n=7)	0,20	9,11+10,11	-40,97+48,92	28,6	0	71,4
	0,10	-1,34+18,01	23,43+13,22	71,4	0	28,6
Гліобластоми (IV ступінь анаплазії) (n=10)	0,20	7,73+10,50	29,18+10,05	80,0	30,0	20,0
	0,10	-24,23+31,01	52,90+15,84	100,0	30,0	0

Примітка: \*1 - достовірність різниці між групами (p<0,02); \*2 - достовірність різниці між групами (p<0,03).

Таблиця 5

Оцінка впливу галавіту на експресію антигенів МНПК хворих з гліомами головного мозку

Гістологічний тип пухлини	Концентрація препарату, мг/мл	CD25 Δ, %	CD54 Δ, %	CD56 Δ, %	HLA-ABC Δ, %	HLA-DR Δ, %
Гліоми (n=17)	0,02	1,04+2,77	0,56+0,99	0,70+0,78	3,80+0,73&	-0,59+0,62
	0,10	-0,18+5,18	0,48+0,65	-0,67+3,74	3,95+1,37	1,10+1,94
Астроцитоми III ступеня анаплазії (n=7)	0,02	-0,85+2,73	0,63+1,43	1,83+0,42	2,70+0,73	-0,70+0,10
	0,10	-1,70+5,77	0,80+0,75	0,70+3,20	6,00+1,37	2,67+0,38
Гліобластоми IV ступінь анаплазії (n=10)	0,02	2,30+2,60	0,50+0,64	-0,15+0,76	4,90+0,73	-0,50+0,84
	0,10	0,83+1,72	0,17+0,48	-2,03+2,67	1,90+1,37	-0,47+1,62

Примітка: & – достовірність різниці у порівнянні з початковим показником (p<0,025).

Таким чином, стосовно зразків МНПК хворих із злоякісними астроцитомами та гліобластомами прослідковувалась тенденція до залежності цитотоксичної дії галавіту від концентрації препарату.

При дослідженні впливу галавіту на експресію CD25,-54,-56, HLA-A,B,C та HLA-DR МНПК хворих на гліоми встановлено, що галавіт в

обох концентраціях підвищував кількість HLA-A,B,C+клітин, не впливаючи суттєво на інші показники (табл.5). Так, під дією препарату у концентрації 0,02 мг/мл частка МНПК хворих з гліомами, які експресують антигени гістосумісності I класу, достовірно зростала (p<0,025); така ж тенденція спостерігалась під впливом концентрації 0,10 мг/мл.

У присутності галавіту в обох досліджених концентраціях кількість PI+ клітин в суспензійних культурах МНПК хворих з гліомами зростала незначно, в середньому на 3% (табл.6). Аналіз показників в залежності від гістологічного типу гліом виявив, що початкові суспензії МНПК хворих з гліобластомами містили меншу кількість PI+ клітин (вірогідність різниці  $p < 0,05$ ) та CD95+клітин,

ніж суспензії МНПК хворих з анапластичними астроцитомами. Під впливом галавіту у суспензійних культурах МНПК хворих з астроцитомами III ступеня анаплазії вказані показники суттєво не змінювались. У суспензійних культурах МНПК хворих з гліобластомами під дією галавіту, навпаки, зростала кількість PI+клітин (на 5%) та дещо зростала частка CD95+клітин (до 3%).

Таблиця 6

**Оцінка впливу галавіту на рівень апоптозу в МНПК хворих з гліомами різного ступеня анаплазії, %**

Гістологічний тип гліом	Концентрація препарату, мг/мл	PI+			CD95+		
		початковий показник	+ галавіт	$\Delta$ , %	початковий показник	+ галавіт	$\Delta$ , %
Гліоми (n=17)	0,02 мг	21,29+4,24	24,07+0,38	2,79+4,63	8,66+0,79	9,74+1,52	1,09+1,95
	0,10 мг		25,55+8,06	3,00+8,97		10,53+2,47	1,65+4,16
Астроцитомы III ступеня анаплазії (n=7)	0,02 мг	27,20+4,10* <sup>1</sup>	26,77+5,67	-0,43+2,08	10,00+1,85	10,17+2,92	0,53+1,98
	0,10 мг		28,27+8,03	1,07+6,47		10,53+1,42	0,17+4,17
Гліобластоми (IV ступінь анаплазії) (n=10)	0,02 мг	16,85+2,84* <sup>1</sup>	22,05+3,86	5,20+4,04	7,65+0,54	9,15+2,80	1,50+1,95
	0,10 мг		22,83+6,07	4,93+8,27		10,90+1,40	3,13+1,78

Примітка: \*<sub>1</sub> - достовірність різниці між групами ( $p < 0,05$ ).

*Вивчення впливу препарату галавіт на дисоційовані довгострокові культури гліобластом.* Як відомо, в довгострокових первинних культурах гліальних пухлин головного мозку протягом перших двох тижнів культивування відтворюються характерні гістотипові особливості їх росту та проліферації, притаманні їх гістоструктурі та ступеню анаплазії in vivo. В даній роботі з метою тестування впливу галавіту на клітини гліом використана модель культивування гліобластом, які відносяться до найбільш злоякісних гістологічних типів серед гліом головного мозку людини. За нашими спостереженнями у динаміці росту контрольних культур протягом перших 3-6 діб клітини гліобластоми адаптуються до умов культивування і в подальшому формують досить поширену зону росту, утворену клітинами ромбовидної, уніполярної, трикутної форми з добре виразною цитоплазмою та конусоподібними відростками. На гістологічних препаратах культур ядра пухлинних клітин переважно поліморфні, круглі або кругло-овальної форми, гіперхромні. Зустрічаються також значно збільшені в об'ємі одно- та багатоядерні клітини. Характерною особливістю всіх культивованих гліобластом є наявність осередків сіткоподібних структур, утворених перетинами довгих клітинних відростків, притаманних пухлинним астроцитомам. Така особливість росту гліобластом в умовах культивування відображує астроцитарний генез більшості з них, що співпадає з даними літератури [12]. В ущільнених ділянках

росту культивованих гліобластом переважали розрощення недиференційованих клітин, серед яких спостерігались різні стадії мітотичного поділу, що свідчить про прискорену проліферацію цих пухлин в умовах культивування (Рис. 1а, 2а). Серед мітотичних фігур переважали патологічні форми. Середній мітотичний індекс складав 3,8%, а частка спонтанно дегенеруючих клітин досягала в середньому 8-12%.

У дослідній серії культур з тестуванням галавіту спостерігався дозозалежний цитотоксичний вплив цього препарату на культивовані клітини гліобластоми. Так, після 24-годинної інкубації культур з галавітом (0,02 мг/мл) виявилось помітне зниження ефективності росту культур у вигляді значного розрідження клітинних масивів за рахунок розривів та десквамації частини клітин (Рис. 1б). Підвищення концентрації препарату до 0,10 мг/мл та збільшення інкубації культур з препаратом до 48 год призводило до подальшого зниження клітинної щільності. На гістологічних препаратах цих культур в переважній більшості пухлинних клітин визначалися різні стадії дистрофічних та некробіотичних змін: цитоплазма клітин закружена, відростки редуковані або втрачені, ядра в стані каріопікнозу, цитоплазма багатьох клітин у стані розпаду (Рис.2б,2в). На місці загиблих клітин залишаються лише окремі комплекси загиблих клітин-тіней.

В табл.7 відображені загальні результати кількісної оцінки деяких показників росту в контрольних та дослідних культурах гліобластом.

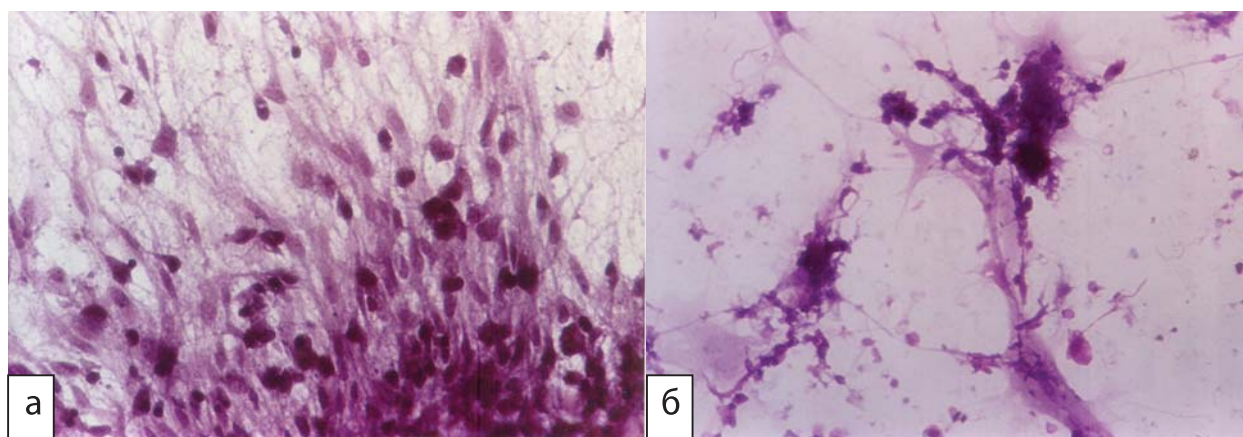


Рис. 1. Культура гліобластоми. 9-та доба культивування. Забарвлення гематоксиліном Караччі. X400: а – контроль; б - після інкубації з галавітом (0,02 мг/мл) протягом 24 год. Пояснення у тексті.

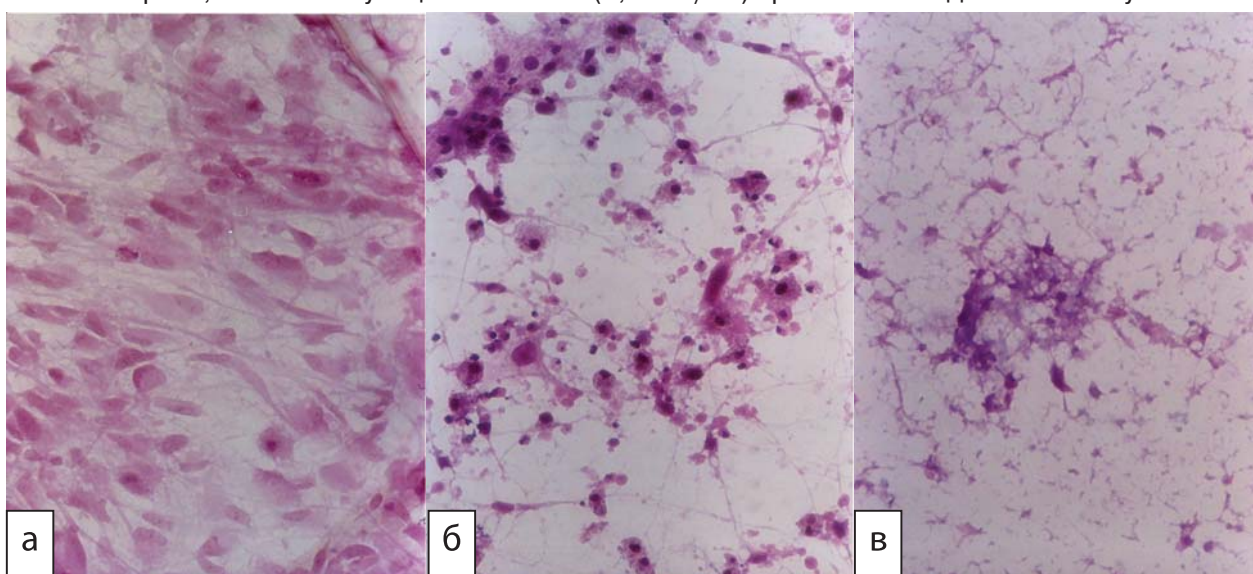


Рис.2. Культура гліобластоми. 16-та доба культивування. Забарвлення гематоксиліном Караччі. X400: а – контроль; б - після інкубації з галавітом (0,02 мг/мл) протягом 48 год; в - після інкубації з галавітом (0,10 мг/мл) протягом 48 год. Пояснення у тексті.

Таблиця 7.

Умови експерименту	Середній мітотичний індекс %	Середній індекс клітин з ознаками цитотоксичності %
Контроль	3,8	8-12
+ Галавіт 0,02 мг/мл 24 год.	1,1	15,4-19,7
+ Галавіт 0,02 мг/мл 48 год.	0,2	29,8-37,0
+ Галавіт 0,10 мг/мл 24 год.	0,9	40,4-48,7
+ Галавіт 0,10 мг/мл 48 год.	0,1	64,7-70,9

### ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати свідчать про те, що в суспензійних культурах галавіт забезпечує цитотоксичний вплив на клітини гліом III та IV ступеня анаплазії, більш суттєво впливаючи на зразки гліом III ступеня анаплазії. Це узгоджується з попередніми даними [9,10], якими встановлено цитотоксичну дію галавіту на клітини суспензійних культур астроцитом, гліобластом та медуллобластом, а також 2-3-кратне пригнічення

проліферації клітин анапластичних астроцитом та медуллобластом. За ступенем вираженості антипроліферативний та цитотоксичний ефекти галавіту були співставлюваними з ефектом цисплатину, який в загальній онкології вважається золотим стандартом антибластичної терапії [9,10].

Під впливом галавіту у суспензійних культурах гліом відбувалось зростання частки клітин, що експресують антигени гістосумісності: HLA-

ABC+ (0,10 мг/мл) клітин у суспензійних культурах гліом III ступеня анаплазії та HLA-ABC+ (0,02 мг/мл) і HLA-DR+ (0,02 мг/мл) клітин у суспензійних культурах гліобластом. На нашу думку, зростання експресії антигенів гістосумісності клітинами анапластичних гліом під впливом галавіту може сприяти розпізнаванню клітин пухлини імунотетентними клітинами.

Як відомо, експресія CD95+ свідчить лише про готовність клітин до апоптозу, а барвник PI виявляє гіподиплоїдні клітини на термінальних стадіях апоптозу та некрозу з втратою частини ДНК [15]. Під впливом галавіту зростала кількість клітин у термінальній стадії апоптозу (PI+) у суспензійних культурах анапластичних астроцитом та кількість CD95+ клітин (що несуть FAS-рецептор апоптозу) у суспензійних культурах гліобластом, що може розцінюватись як показник позитивного проапоптотичного впливу препарату. Можна припустити, що проапоптотичний вплив галавіту на клітини гліом реалізується не тільки за участю CD95/CD95L- системи, але також із залученням інших сигнальних шляхів апоптозу: рецепторно-незалежних (сигнальні шляхи активації каспази 9) і рецепторно-залежних (при активації інших рецепторів "регіона клітинної смерті" TNFR1, CAR1, DR3, DR4, DR5, p75-NGF та ін.).

Аналіз цитотоксичного впливу галавіту на суспензійні культури МНПК хворих виявив більшу чутливість до впливу галавіту у МНПК хворих з гліобластомами (IV ступінь анаплазії), ніж у хворих з гліомами III ступеня анаплазії. Крім того, галавіт в обох досліджених концентраціях демонстрував тенденцію до незначного проапоптотичного впливу на МНПК хворих з гліобластомами, збільшуючи кількість МНПК, що несуть FAS-рецептор, експресія якого відображає готовність до апоптозу, та МНПК у термінальній стадії апоптозу. В той же час на МНПК хворих з анапластичними астроцитомами подібного впливу не виявлено, що, вочевидь, пояснюється ступенем молекулярно-генетичних змін у клітинах хворих-носіїв пухлини в залежності від гістобіологічного типу гліоми та рівня злоякісної трансформації.

Дослідження впливу галавіту на дисоційовані довгострокові культури гліобластом показали, що інкубація культивованих гліобластом з галавітом викликає пригнічення міграційної та проліферативної активності пухлини та індукує появу ознак дозозалежної токсичної дії препарату у вигляді дистрофічних та некробіотичних змін в пухлинних клітинах з прогресуючим порушенням загальної структури зони росту. Ці ознаки суттєво посилюються із збільшенням тривалості інкубації культур з препаратом, а також із збільшенням його концентрації. Це значною мірою підтверджує результати, отримані на суспензійних культурах цих пухлин, які показують, що

галавіт виявляє прямий цитотоксичний та цитодеструктивний антибластичний ефект.

Таким чином, галавіт забезпечує цитотоксичну дію на пухлинні клітини гліобластом як в суспензійних короткотермінових, так і дисоційованих довготривалих культурах, в яких відтворюються гістотипові властивості росту цих злоякісних гліом.

Деякі відмінності впливу дослідженого препарату на суспензійні короткотермінові та на дисоційовані довгострокові культури гліобластом можна пояснити різним характером та способами оцінки дії препаратів у кожному з цих методів. В суспензійних короткострокових (24 год) культурах свіжовиділених клітин пухлини при підрахунку життєздатних і PI+клітин реєструється прямий цитотоксичний та опосередкований проапоптотичний вплив препарату з визначенням клітин у незворотній стадії апоптозу. На відміну від суспензійних, в дисоційованих довгострокових культурах спочатку відбувається формування гістотипової динамічної зони росту з пухлинних клітин, найбільш адаптованих до нових умов існування поза організмом, які володіють високим проліфераційним потенціалом. При тестуванні впливу галавіту в таких культурах гліобластом у порівнянні з контрольними надається можливість спостерігати просторові та локальні зміни як в загальній архітектоніці зони росту, так і в цитоструктурі окремих її клітин з порівняльною оцінкою міграційної та проліфераційної активності клітин культивованої пухлини з кількісним урахуванням частки дистрофованих та некробіотично змінених клітин.

Таким чином, спосіб тестування галавіту в довгострокових культурах гліобластом суттєво доповнює аналогічні результати, отримані в суспензійних короткострокових культурах гліобластом відносно протипухлинних властивостей галавіту.

Виявлене в наших дослідженнях в результаті впливу галавіту підвищення кількості клітин, що експресують антигени гістосумісності (HLA-ABC, HLA-DR), у суспензійних культурах анапластичних гліом може потенційно бути сприятливим фактором для розпізнавання клітин пухлини імунотетентними клітинами. В той же час зростання частки клітин, що експресують CD95 (FAS-рецептор апоптозу) у суспензійних культурах гліом III ступеня злоякісності може розцінюватись як позитивна дія препарату. Таку спрямованість впливу галавіту можна пояснити тим, що він є індуктором інтерферону [16]. Як відомо, у хворих на гліоми продукція IFN- $\gamma$  клітинами периферичної крові пригнічена прямопропорційно залежно від ступеня злоякісності гліальної пухлини [17].

За даними літератури, IFN- $\gamma$  підвищував експресію антигенів MHC I і MHC II класу та ICAM-



1 на клітинах гліосаркоми 9L [18]; антигенів МНС I і МНС II класу у клітинах злоякісної гліоми [19-21]; IFN- $\gamma$  відновлював експресію білків-транспортів TAP1 та індукував трансактиватор СІТА у клітинах злоякісної гліоми [20,21]. В нашому дослідженні під дією галавіту при застошуванні концентрації препарату 0,10 мг/мл підвищувалась експресія HLA-ABC (МНС I класу) клітинами гліом III ступеня анаплазії. При тестуванні концентрації галавіту 0,02 мг/мл підвищувалась також експресія CD54 (ICAM), HLA-ABC (МНС I класу) та HLA-DR (МНС II класу) клітинами гліобластом. Крім того, препарат в обох застосованих концентраціях підвищував експресію HLA-A,B,C (МНС I класу) мононуклеарами хворих з гліомами.

Відомо також, що при додаванні IFN- $\gamma$  в гліомних клітинах підвищувався рівень експресії Fas і FasL, каспази-8, Вах [22]. Така зміна експресії молекул, які відносяться до рецептор-залежного і незалежного шляхів клітинної смерті, призводила до апоптозу гліомних клітин [22]. За нашими даними, під впливом галавіту підвищувалась експресія CD95 (Fas) клітинами гліобластом.

IFN- $\gamma$  впливає на основні характеристики злоякісних гліом: знижує життєздатність та інгібує проліферацію клітин, а також знижує міграцію клітин гліобластоми людини A172 [18]. В нашому дослідженні після інкубації з галавітом також спостерігалось зменшення міграційної та проліферативної активності клітин культивованої гліобластоми.

Необхідно наголосити, що частина зразків злоякісних гліом у суспензійних культурах виявилась нечутливою до тестованих концентрацій галавіту, що свідчить про коливання індивідуальної чутливості різних гліом. Поряд з цим, препарат виявив ознаки дозозалежної цитотоксичної та проапоптотичної дії на МНПК хворих з гліомами, особливо з гліобластомами. У зв'язку з усім вищевикладеним ми вважаємо обґрунтованим продовження клінічних досліджень, спрямованих на подальше вивчення впливу галавіту *in vivo* у хворих з гліомами головного мозку, необхідною умовою якого є попереднє дослідження індивідуальної чутливості клітин пухлин та МНПК хворих до дії препарату *in vitro* та підбір оптимальних терапевтичних доз.

### **ВИСНОВКИ:**

1. В короткострокових суспензійних культурах встановлено цитотоксичний вплив галавіту в концентраціях 0,02 мг/мл і 0,10 мг/мл на 70-80% зразків гліом III та IV ступеня анаплазії. Більшу чутливість до впливу галавіту виявили клітин гліом III ступеня анаплазії у порівнянні з гліобластомами (IV ступінь анаплазії).

2. Під впливом галавіту зростала кількість клітин у термінальній стадії апоптозу (PI+) у суспензійних культурах анапластичних астроцитом та кількість CD95+ клітин (що несуть FAS-рецептор апоптозу) у суспензійних культурах гліобластом, що свідчить про проапоптотичний вплив препарату на клітини злоякісних гліом.
3. В дисоційованих довгострокових культурах гліобластом людини галавіт пригнічує міграційну та проліфераційну активність пухлинних клітин та індукує ознаки дозозалежного цитотоксичного та цитодеструктивного ефекту, який зростає із збільшенням тривалості інкубації культур з препаратом та збільшенням його концентрації.
4. Встановлено дозозалежний цитотоксичний вплив галавіту на МНПК хворих із злоякісними гліомами. Більшу чутливість до впливу галавіту виявили МНПК хворих з гліобластомами (IV ступінь анаплазії), ніж хворих з гліомами III ступеня анаплазії, що пояснюється ступенем молекулярно-генетичних змін у клітинах хворих-носіїв пухлини в залежності від гістобіологічного типу гліоми та рівня злоякісної трансформації.
5. Під впливом галавіту в обох досліджених концентраціях зростала кількість CD95+МНПК хворих з гліобластомами та МНПК у термінальній стадії апоптозу, що свідчить про проапоптотичний вплив препарату на МНПК хворих з гліобластомами, на відміну від МНПК хворих з анапластичними астроцитомами.
6. Інкубація з галавітом підвищувала експресію антигенів гістосумісності (HLA-ABC, HLA-DR) клітинами анапластичних гліом та збільшувала частку МНПК хворих з гліомами, що експресують антигени гістосумісності I класу.
7. Результати комплексної оцінки особливостей впливу галавіту на клітини анапластичних та злоякісних гліом головного мозку людини, досліджених за допомогою різних методичних підходів *in vitro*, надають підставу вважати цей препарат перспективним для використання в клінічній практиці комбінованого лікування нейроонкологічних хворих на гліоми.

### **ЛІТЕРАТУРА:**

1. Галавит. Клиническое использование и механизмы действия / [А.А. Подколзин, Т.И. Гришина и др.]; под. ред. А.А. Подколзина, Т.И. Гришиной.-Изд-во «Внешторгиздат»: М., 2002.-104 с.
2. [Galavit-induced change of immunologic parameters in patients with non-small lung cancer] / L.Z.Vel'sher, Z.R.Gabuniia, T.I.Grishina [et al.] // Vopr.Onkol.-2009.-55(1).-P.51-55.

3. Шульженко А.Е. Галавит в терапии хронической рецидивирующей герпес-вирусной инфекции / А.Е.Шульженко, И.Н. Зуйкова // Новые лек. средства. — 2003. — №3. — С.23-27.
4. Shaplygin L.V. [The efficiency of the drug "Galavit" in complex treatment for infectious-and-inflammatory diseases of urogenital system] / L.V.Shaplygin, A.M.Klopot // Voen. Med.Zh.-2006.- 327(3).-P.29-34.
5. Sukhorukov A.L. [Galavit efficiency in prophylaxis and treatment of pyo-inflammatory complications at abdominal surgical pathology] / A.L.Sukhorukov // Voen.Med.Zh.-2005.- 326(6).-P.31-33.
6. Латышева Т.В. Новые возможности направленной иммунологической коррекции на примере отечественного иммуномодулятора галавит / Т.В.Латышева, О.А.Щербакова // Рос. аллергол. журн. — 2004. — №1. — С.77-81.
7. Сонова М.М. Использование иммуномодулятора галавит в комплексном лечении железисто-фиброзных полипов эндометрия у больных репродуктивного возраста: Автореф.дис. канд.мед.наук. / М.М.Сонова. -М., 2000.-24 с.
8. Опыт лечения дисплазии шейки матки у женщин с HPV препаратом галавит / П.Н.Кротин, Е.О.Паленко, О.Ю.Ландина [и др.] // Леч. дело.-2003.-№8.-С.75.
9. Изучение влияния иммуномодулятора галавита на злокачественные опухоли мозга / Н.И.Лисяний, В.М.Семенова, Л.И.Примушко [и др.] // VII Поленовские чтения: Тезисы Всероссийской научно-практической конференции (Санкт-Петербург, 27-30 апреля 2008г.).- СПб., 2008.- С.273.
10. Дослідження протипухлинної дії імуномодуючого препарату галавіт / Л.І.Примушко, В.М.Семенова, О.М.Лісяний // Укр.нейрохірург.журнал.-2007.-№1.-С.32-36.
11. Louis D.N. WHO classification of tumours of the central nervous system / D.N.Louis, H.Ohgak, O.D.Wiestler.- Lyon: International agency for research on cancer, 2007.-312p.
12. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / [В.П.Божкова, Л.А.Брежестовский, В.М.Буравлев и др.]; под ред. В.П.Божковой.- М.:Наука, 1988.-318 с.
13. Шпакова А.П. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток / А.П.Шпакова, К.С.Павлова, Т.И.Булычева // Клин.лаб.диагностика.-2000.-№ 2.-С.20-23.
14. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей-лаборантов / [Пинегин Б.В. и др.]; под ред. Б.В.Пинегина.-М., 2001.- С.48-53.
15. Циклаури М.В. Нарушение функции иммунной системы и апоптоза лимфоцитов при травме и осложнений стафилококком / М.В.Циклаури, Н.В.Гогешвили // Імунологія та алергологія.- 2003.-№4.-С.37-38.
16. Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers / D.S.Silin, O.V.Lyubomska, F.I.Ershov [et al.] // Curr. Pharm.Des.-2009.-15(11).-P.1238-1247.
17. Лісяний М.І. Цитокінсинтезуюча функція імунокомпетентних клітин крові у хворих на гліоми головного мозку / М.І.Лісяний, С.А.Скітяк // Імунологія та алергологія.-2003.-№ 3.- С.10-13.
18. Gamma interferon transduced 9L gliosarcoma. Cytokine gene therapy and its relevance to cellular therapy with alloreactive cytotoxic T lymphocytes / D.B.Paul, S.B.Read, N.V.Kulprathipanja [et al.] // J.Neurooncol.-2003.-64(1-2).-P.89-99.
19. Dutta T. Robust ability of IFN-gamma to upregulate class II MHC antigen expression in tumor bearing rat brains / T.Dutta, A.Spence, L.A.Lampson // J.Neurooncol.-2003.-64(1-2).-P.31-44.
20. Human alloreactive CTL interactions with gliomas and with those having upregulated HLA expression from exogenous IFN-gamma or IFN-gamma gene modification / S.B.Read, N.V.Kulprathipanja, G.G.Gomez [et al.] // J.Interferon Cytokine Res.-2003.-23(7).-P.379-393.
21. Reduced expression of the transporter associated with antigen processing 1 molecule in malignant glioma cells, and its restoration by interferon-gamma and -beta / E.Satoh, T.Mabuchi, H.Satoh [et al.] // J.Neurosurg.-2006.-104(2).-P.264-271.
22. Glioma apoptosis induced by macrophages involves both death receptor-dependent and independent pathways / G.G.Chen, E.C.Chak, Y.S.Chun [et al.] // J.Lab.Clin.Med.-2003.-141(3).-P.190-199.

**РЕЗЮМЕ**

**ОСОБЕННОСТИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГАЛАВИТА НА КЛЕТКИ ГЛИОМ И МОНОНУКЛЕАРЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ГЛИОМАМИ in vitro**

*Любич Л.Д., Лисяный Н.И., Семенова В.М., Главацкий А.Я., Лисяный А.Н., Стайно Л.П.*

ГУ «Институт нейрохирургии им.акад.А.П.Ромоданова НАМН Украины», Киев

Цель работы – изучение влияния иммуномодулятора галавит на клетки глиом в суспензионных и диссоциированных культурах и на мононуклеары периферической крови (МНПК) больных с глиомами in vitro. В краткосрочных суспензионных культурах галавит (0,02 и 0,10 мг/мл) оказывал цитотоксическое действие на 70-80% образцов глиом III и IV степени анаплазии (более выраженное на клетки глиом III степени анаплазии), проапоптотически влиял на клетки злокачественных глиом (увеличивал количество клеток в терминальной стадии апоптоза (PI+) в культурах анапластических астроцитом и количество CD95+ клеток (FASR+) в культурах глиобластом). В диссоциированных длительных культурах глиобластом галавит угнетал миграционную и пролиферационную активность опухолевых клеток и индуцировал признаки дозозависимого цитотоксического и цитодеструктивного действия. Галавит дозозависимо цитотоксически влиял на МНПК больных со злокачественными глиомами (более чувствительными были МНПК больных с глиобластомами). Инкубация с галавитом повышала экспрессию антигенов гистосовместимости (HLA-ABC, HLA-DR) клетками анапластических глиом и увеличивала долю МНПК больных с глиомами, экспрессирующих антигены гистосовместимости I класса.

**Ключевые слова:** галавит, глиомы головного мозга, МНПК, суспензионные культуры, диссоциированные культуры.

**SUMMARY**

**FEATURES OF GALAVIT CYTOTOXIC ACTION ON GLIOMA CELLS AND PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PATIENTS WITH BRAIN GLIOMA in vitro**

*Liubych L.D., Lisyany N.I., Semenova V.M., Glavatskiy A. Ya., Lisyany A.N., Stayno L.P.*

SI «Acad.A.P.Romodanov Institute of Neurosurgery Nat.Acad. Med.Sci. of Ukraine», Kyiv

The purpose of paper – to study the effect of immunomodulator galavit on glioma cells in suspended and dissociated cell cultures as well as on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with brain glioma in vitro. In short-term suspended cultures galavit (0,02 and 0,10 mg/ml) provided cytotoxic effect on 70-80% samples of glioma grade III and IV (more effective on cells of glioma grade III), proapoptotically influenced on malignant glioma cells (increased the number of cells in terminal apoptosis stage (PI+) in anaplastic astrocytoma cultures and number of CD95+ cells (FASR+) in glioblastoma cultures). In dissociated long-term glioblastoma cultures galavit inhibited the tumor cells migration and induced the signs of dose-dependent cytotoxic and cytodestructive effect. Galavit provided cytotoxic dose-dependent effect on the PBMC of patients with malignant glioma (PBMC of patients with glioblastoma were more sensitive). Incubation with galavit increased the expression of histocompatibility antigens (HLA-ABC, HLA-DR) by anaplastic glioma cells and increased the percentage of MHC-I+PBMC of glioma patients.

**Key words:** galavit, brain gliomas, PBMC, suspended cell cultures, dissociated cell cultures.

УДК: 616.311.2-002.153-053.4-092.19-085.8

**ВПЛИВ ЛАЗЕРНОЇ ТЕРАПІЇ ТА ДІАДИНАМОФОРЕЗУ НА СТАН МІСЦЕВОГО ІМУНІТЕТУ ПОРОЖНИНИ РОТА ПІДЛІТКІВ, ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ КАТАРАЛЬНИЙ ГІНГІВІТ**

*ГРИНЬОХ В.О.*

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Аналіз клінічних і експериментальних даних свідчить про те, що найбільш частими захворюваннями пародонту, особливо у дітей, є гінгівіт, з перевагою хронічного катарального гінгівіту (ХКГ) [1, 5, 6, 8, 10, 11]. Вагома роль у патогенезі ХКГ належить умовно-патогенній мікрофлорі, яка персистує на слизовій оболонці (СО) ясен [13, 16, 17]. На сьогоднішній день мікрофлора

порожнини рота розглядається як один із найважливіших стимуляторів запуску імунологічних реакцій в СО, що визначає значну роль імунологічних реакцій у розвитку гінгівіту [17, 21]. Порушення гомеостазу мікрофлори, наприклад, після застосування антибіотиків, значно ослаблює опірність організму до інфікування СО [21]. Ультроструктурний аналіз СО ясен підлітків, хворих