

УДК 612.017.1:616.151:616.831–006.484

**ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И АДГЕЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ГЛИОМАМИ***ЛИСЯНЫЙ Н.И., ГНЕДКОВА И.А., ГНЕДКОВА М.А., РОЗУМЕНКО В.Д., ГЛАВАЦКИЙ А.Я., ШМЕЛЕВА А.А., МАЛЫШЕВА Т.А., ЧЕРНЕНКО О.Г.*

ГУ "Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова"

Предыдущими исследованиями были выявлены некоторые иммунологические особенности клинического течения глиом различной степени анаплазии. [1]. Были установлены также особенности иммунного статуса при различных клинических стадиях опухолевой болезни головного мозга: при клинической ремиссии и при продолженном росте глиомы [ 2 ].

Многочисленными исследованиями было также показано, что клетки глиомы и факторы, продуцируемые ими, подавляют иммунный ответ и индуцируют превращение моноцитов-макрофагов в субпопуляцию макрофагов M2, способствующую прогрессивному росту опухоли. Установлено, что Mф2-клетки подавляют фагоцитоз, индуцируют секрецию иммуносупрессорных цитокинов IL10, TGFβ. Субпопуляция макрофагов Mф1 способна убивать опухолевые клетки, тогда, как Mф2 усиливают рост опухоли.[3]. Mф1 продуцируют IL12, IL23, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> и незначительное количество IL10, NO. Mф2 участвуют в стимуляции роста опухоли и продуцируют VEGF, EGF, TGFβ, IL8, IL4, IL13. Молекулярные механизмы превращения Mф обусловлены программой транскрипции с участием NFκappa, STAT3, HIF1. Установлено, что M2 отличаются от M1 в процессе способностью адаптироваться к гипоксии – одному из важнейших факторов опухолевой прогрессии [4]

Активация Mф1 в Mф2 индуцируется синтезом IL4/ IL13 , при этом увеличивается синтез аргиназы, которую рассматривают как основной ограничитель синтеза NO и полиаминов, а также как центральный механизм подавления цитотоксичности Mф.[5].

Mф1- классические макрофаги активируются IFNγ и TNFα, а альтернативные макрофаги- Mф2 активируются IL4/IL13 . IFNγ подавляет активность альтернативно активированных макрофагов, а IL4/ IL13 подавляет активность классически активированных. Mф1 клеток.[5].

Клеточное прилипание и распластывание - важнейшие характеристики макрофагов, необходимые для фагоцитоза, межклеточной кооперации, экстравазации и других свойств фагоцитов, которые изменяются в процессе активации этих клеток.

Адгезия мононуклеаров к пластику осуществляется также за счет рецепторов интегринов и фибронектина (CD45). За адгезивные свойства

макрофагов отвечают их поверхностные рецепторы - селектины и интегрины. Наиболее важными интегринными для фагоцитарного процесса являются 3 гетеродимера, состоящие из общей β цепи (CD 18) и 3 α цепи (CD11α, CD11β, CD11c.). В настоящее время установлена роль гликоконъюгатов в формировании эффекторных молекул на мембранах лимфоцитов киллеров, ЕК, NK, нейтрофилов и моноцитов-макрофагов.

Молекула CD45 участвует в опосредованной интегринными адгезии макрофагов, контроле апоптоза Т клеток, опосредованном IgE. Молекула CD45 была определена как Jak фосфотаза, которая регулирует сигнальный путь для цитокинов через Jak/Stat, контролируя опосредованную цитокинами активацию, пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов.

При опухолях различной локализации снижаются эффективные эффекторные свойства моноцитов-макрофагов. в том числе при глиомах головного мозга. [6]

У больных глиомами в периферической крови снижается содержание CD14 моноцитов, экспрессирующих рецептор к ЛПС, но не CD11b – рецепторами к интегринам.

В связи с этим, важно было изучить изменения цитотоксической и адгезивной функции мононуклеаров периферической крови у больных с глиомами.

Целью исследований являлось изучить адгезивную и цитотоксическую активность мононуклеаров, выделенных из периферической крови больных с глиомами различной степени анаплазии и мононуклеаров периферической крови здоровых людей.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Было изучено 98 больных глиомами и 20 здоровых лиц. Из них 11 больных астроцитомами, фибриллярно-протоплазматическими, 58- анапластическими глиомами и 29-глиобластомами. Забор периферической крови проводился в день оперативного вмешательства. Клетки опухоли выделяли из биоптического материала, полученного во время оперативного вмешательства.

Для получения суспензии опухолевых клеток кусочки опухоли разрезали на фрагменты по 2-3 мм, затем разбивали шприцом с толстой иглой. Полученную суспензию дезагрегировали

центрифугированием, затем суспензию клеток повторно ресуспендировали в среде 199 и пропускали через нейлоновый фильтр, дважды отмывали в ЗФР, подсчитывали количество клеток в 3% уксусной кислоте и оценивали жизнеспособность клеток опухоли в 0,1% растворе трипанового синего. Клетки в рабочей концентрации вносили в полную среду RPMI без сыворотки.

Мононуклеары периферической крови выделяли на градиенте фиколл-верографина  $d=1.077$ . После трехкратного отмывания и подсчета, клетки в рабочей концентрации в дозе  $4 \times 10^6$  в мл в объеме 2 мл среде 199 наносили на пластиковые чашки и культивировали в термостате при  $37^\circ\text{C}$ . Через 30 и 90 минут не прилипшие к пластику клетки собирали в центрифужные пробирки в среде 199, а прилипшие снимали раствором Версена. После отмывания клеток проводили подсчет их количества в 3% уксусной кислоте и процент жизнеспособных клеток в 0,1% растворе трипанового синего.

Параллельно мононуклеары в дозе  $4 \times 10^6$  в 0,1мл среды вносили в лунки плоскодонного планшета. Через 30 и 90 минут культивирования не прилипшие к пластику клетки переносили в соседний ряд, а к прилипшим клеткам добавляли 0,1 мл среды. К фракции прилипающих и неприлипающих мононуклеаров после разделения через 90 минут добавляли аллогенные свежeweделенные опухолевые клетки. Цитотоксическую активность интактных, прилипших к пластику и неприлипших мононуклеаров по отношению к клеткам глиом различной степени анаплазии оценивали колориметрическим способом с использованием МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5 – дифенилтетразолиум бромид]. [8].

При постановке цитотоксического теста использовали соотношения эффектор-мишень 10:1

Цитотоксическую активность (ЦА) выражали цитотоксическим индексом (ЦИ) в %:

$$\text{ЦИ} = 100 - 1 \frac{\text{Оп} + \text{м} - \text{Опэ}}{\text{Опм}} \times 100 \%$$

где Оп э+м – оптическая плотность ( Оп) в лунках эффекторы+мишень

Опэ – значение Оп в лунках, содержащих только клетки – эффекторы (лимфоциты)

Опм – значение ОП в лунках, в которых находились только клетки-мишени. аллогенные опухолевые клетки

Изучали субпопуляционный состав периферических мононуклеаров, а также прилипающей и неприлипающей фракций и мононуклеаров суспензии опухолевых клеток с помощью моноклональных антител CD3, CD11, CD14, CD16, CD56, CD45, CD54, CD 34, CD38. [ 9].

Достоверность отличий по критерию Стьюдента.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи стандарт-

ного компьютерного пакета «Анализ данных» Microsoft Excel для Windows 1995, версия 7.0a, 1996 г.

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Были изучены адгезивные свойства мононуклеаров периферической крови к пластику у больных внутримозговыми глиомами и доноров

При изучение адгезивной активности мононуклеаров периферической крови было отмечено, что среди мононуклеаров периферической крови больных глиомами во все сроки культивирования было достоверно больше прилипающих клеток, чем среди мононуклеаров здоровых лиц.

Было установлено, что после 30 - минутной инкубации на пластиковых чашках несколько больше прилипает мононуклеаров, чем после инкубации 60 и 90 минут и доноров, и больных (Табл.1).

Было также отмечено, что после 30- минутного культивирования прилипало к пластику 50% мононуклеаров периферической крови, причем мононуклеары периферической крови больных адгезировались больше, чем доноров ( $58,3 \pm 1,1$ )% и ( $52,1 \pm 3,1$ )% соответственно.

Прилипание к пластику отражает активность эффекторных реакций иммуногенеза и представляет сложный интегральный процесс, который сопровождается активацией более 100 различных рецепторов, которые представляют как врожденную, так и адаптивную иммунную систему. В связи с этим, важно было адгезивную функцию мононуклеаров больных глиомами и здоровых лиц сопоставить с цитотоксической активностью.

Было установлено, что ЦА мононуклеаров здоровых лиц составляет ( $65,1 \pm 9,1$ )% по отношению к аллогенным опухолевым клеткам. Причем, у здоровых ЦА прилипающих к пластику фракции мононуклеаров после 30 минут инкубации и клеток неприлипающей фракции, примерно, в сумме составила значения ЦА неразделенной суспензии мононуклеаров (Табл.2). Это, в определенной степени, можно объяснить многофакторностью составляющих ЦА мононуклеаров у здоровых лиц в норме.

У больных глиобластомами ЦА мононуклеаров периферической крови была в 5 раз ниже, чем у здоровых лиц (Табл.2 ). После 30- минутного культивирования на пластике и отделения от неприлипающей фракции клеток ЦА прилипающей фракции мононуклеаров увеличилась в 2,5 раз и составила ( $36,1 \pm 2,1$ )%, что соответствовало показателям у здоровых лиц ( $35,5 \pm 7,1$ )%. ЦА неприлипающей фракции клеток у больных незначительно повышалась и составила ( $19,2 \pm 3,6$ )%. Можно предположить, что определенное восстановление ЦА моноцитов-макрофагов у больных глиомами после 30 ми-

нутной инкубации на пластике может быть обусловлено совокупностью факторов среди которых можно отметить неспецифическую активацию рецепторов моноцитов-макрофагов отрицательно заряженными полимерными молекулами пластика. Возможно также, что отделение неприлипающих клеток через 30 минут инкубации убирает супрессорное воздействие других популяций неприлипающих клеток на моноциты-макрофаги. (Табл.2)

После культивирования 90 минут ЦА мононуклеаров прилипающей и неприлипающей фракций у здоровых лиц снижалась, тогда, как у больных. ЦА мононуклеаров изменялась разнонаправлено. Количество клеток прилипающей фракции у больных снижалось, подобно фракции здоровых лиц (Табл.2). В неприлипающей фракции клеток ЦА увеличивалась практически в два раза, по сравнению с исходными значениями, и достоверно выше, по сравнению с соответствующими значениями ЦА неприлипающей фракции у здоровых лиц. Повышение ЦА неприлипающей фракции мононуклеаров у больных после 90 минут культивирования, возможно, связано с увеличением активности клеток киллеров после удаления супрессорного действия моноцитов-макрофагов (Табл.2). Такое увеличение ЦА мононуклеаров в неприлипающей фракции может быть связано с большим содержанием клеток в этой фракции (Табл1), а также с удалением из этой фракции клеток с супрессорной активностью и активации клеток с ЦА.

Подводя итог полученным данным можно высказать мнение, что разделение мононуклеаров периферической крови на пластиковых чашках Петри зависит от времени их разделения и влияет на их ЦА. Увеличение времени адгезии с 30 до 90 минут приводит не к увеличению, а к снижению количества прилипших клеток, примерно, на (40-45)% у здоровых лиц и у больных с глиомами. ЦА мононуклеаров периферической крови у здоровых лиц и больных с глиомами изменяется по-разному. У здоровых лиц в зависимости от времени адгезии отмечается постепенное снижение ЦА как прилипающей, так и неприлипающей фракции клеток. У больных с глиомами мозга было выявлено, что после 30-минутной адгезии мононуклеаров происходит трехкратное увеличение ЦА прилипающей фракции клеток и незначительное повышение ЦА в неприлипающей фракции клеток, что может быть связано с неспецифическим влиянием пластика на клетки прилипающей фракции мононуклеаров больных с глиомами, в отличие от здоровых лиц.

90-минутная инкубация приводит к снижению ЦА прилипающей фракции и у больных, и у здоровых лиц и достоверно увеличивает ЦА неприлипающей фракции больных, по сравнению

с исходными значениями (Табл.2) Следовательно, ЦА больных глиомами обратима и может восстанавливаться после 30-минутной адгезии на пластике. в прилипающей фракции клеток, а после более длительного культивирования в неприлипающей фракции клеток.

Для уточнения возможных причин подавления и активации ЦА у больных и здоровых лиц был изучен субпопуляционный состав периферических мононуклеаров, выделенных на градиенте, а также прилипающей и неприлипающей фракций после инкубации на пластике 30 и 90 минут. (Табл.3 и 4).

Было установлено, что мононуклеары периферической крови здоровых лиц и больных с глиомами, выделенных на градиенте существенно не различаются по субпопуляционному составу и экспрессии CD антигенов, за исключением содержания рецепторов моноцитов-макрофагов CD11 $\beta$  и CD14 (табл. 3,4). У здоровых лиц отмечено относительное преобладание CD14 мононуклеаров, тогда, как у больных с глиомами относительное содержание CD11 $\beta$ . Так, у доноров соотношение CD14/CD11 составило 1,45 $\pm$ 0,05, а у больных глиомами это соотношение было меньше 1 и составило 0,95 $\pm$ 0,05. У больных глиомами в периферической крови несколько больше содержалось CD8, CD16 мононуклеаров., по сравнению с соответствующими показателями у доноров. После 30 и 90 – минутной инкубации клеток на чашках Петри с последующим определением субпопуляционного состава мононуклеаров в прилипающей и неприлипающей фракциях был установлен, примерно одинаковый состав клеток в этих фракциях как у здоровых, так и у больных с глиомами, за исключением CD11 – клеток, являющихся макрофагальной субпопуляцией и CD8- цитотоксических лимфоцитов. Количество клеток с этими фенотипическими признаками увеличивается в обеих фракциях и у больных глиомам, и у здоровых лиц, что позволяет предположить, что в процессе адгезии происходит дополнительная экспрессия рецепторов мононуклеаров. Так, например, количество CD11<sup>+</sup> клеток у здоровых лиц до адгезии составляло (6,5 $\pm$ 1,1)%, а после 30-минутной адгезии в прилипающей фракции стало (8,3 $\pm$ 1,1)% а неприлипающей (12,1 $\pm$ 1,3)%

В процессе адгезии мононуклеаров крови на пластике как больных, так и здоровых лиц не удалось выделить чистую фракцию макрофагов, а только добиться увеличения содержания макрофагов на 2-3 % у здоровых лиц и, примерно в два раза у больных глиомами, у которых происходило увеличение CD11 клеток с (8,8 $\pm$ 1,7)% до (14,1 $\pm$ 1,2)%. Вероятно, увеличение CD11<sup>+</sup> макрофагов в прилипающей фракции и приводит к увеличению цитотоксической активности

этой фракции. Субпопуляция CD14 макрофагов присутствовала во всех фракциях в таком же количестве, как и в исходной суспензии. Индекс CD14/CD11 клеток при глиомах снижен, но после адгезии он восстанавливался, что также косвенно свидетельствует о связи этих клеток с цитотоксической активностью. Уровень цитотоксических CD8<sup>+</sup> лимфоцитов NK клеток во фракциях при различной длительности адгезии не коррелировали с динамикой цитотоксичности и оставались, примерно, на одном уровне, что не позволяет связать изменение ЦА с этими клетками.

Обращает на себя внимание трехкратное увеличение содержания CD34<sup>+</sup> клеток у больных с глиомами, по сравнению со здоровыми, и их двукратное снижение после адгезии. Не исключено, что эта малая популяция клеток обладает иммуносупрессорным влиянием на ЦА мононуклеаров у больных глиомами.

Восстановление ЦА мононуклеаров у больных после 30 минутной инкубации на пластике сопровождалось достоверным увеличением содержания CD11β клеток и некоторым увеличением соотношения CD14/CD11β. (Табл.3)

Снижение ЦА моноцитов-макрофагов у больных после 90-минут инкубации к пластику сопровождалось снижением содержания CD11β в прилипшей фракции до исходного уровня и снижением содержания CD16 и CD56 лимфоцитов (Табл.3). Увеличение ЦА неприлипающей фракции мононуклеаров после 90-минут адгезии у больных сопровождалось увеличением содержания CD56 и CD11β мононуклеаров (Табл.3), и у доноров после 30 минутной адгезии на пластике было отмечено снижение ЦА прилипающей и неприлипающей фракций мононуклеаров, по сравнению с исходной активностью (Табл.2). Возможно, это связано с разобщением нормальных интегративных эффекторных реакций мононуклеаров и разделением киллерных клеток на две фракции прилипающую и неприлипающую фракции. Так, соотношение CD14/CD11β снижалось в прилипающей и неприлипающей фракциях мононуклеаров, отмечалась тенденция увеличения CD8 клеток и снижения CD56 мононуклеаров (Табл.4).

При 90-минутной инкубации мононуклеаров на пластике у здоровых лиц достоверно увеличивается адгезия CD11 и CD14 клеток, но при этом отмечено снижение ЦА в обеих фракциях клеток, примерно, в два раза. Следовательно, при длительном 90-минутном инкубации *in vitro* мононуклеаров здоровых лиц происходит снижение их цитотоксической активности, по-видимому, связанной с потерей ими цитотоксических факторов – гранзимов и перфоринов.

На основании полученных данных можно высказать предположение, что неспецифиче-

ская стимуляция отрицательно заряженными полимерами пластика мононуклеаров периферической крови у больных глиомами активирует рецепторы моноцитов CD11β, что способствует повышению в 2-3 раза ЦА мононуклеаров больных, по отношению к аллогенным опухолевым клеткам. Необходимо также отметить, что накоплено значительное количество сведений о снижении содержания CD14 клеток в периферической крови у больных со злокачественными глиомами [6]. Возможно, кратковременное культивирование на пластике мононуклеаров будет способствовать восстановлению антигенпрезентирующей и ЦА функции Мн/Мф у больных с глиомами. При адгезии на пластике мононуклеаров периферической крови у больных с глиомами происходит, по-видимому, утрата супрессорной активности у Мф2 – продукции ими супрессорных цитокинов IL10 и TGFβ. Кроме этого, супрессорные и цитотоксические факторы в силу низкой концентрации не могут проявить своего действия на киллерные клетки.

Проведенными исследованиями также показано, что популяция CD11β, клеток у больных и здоровых лиц отличается по своим адгезивным свойствам. Так, у здоровых лиц максимальная адгезия мононуклеаров отмечается через 90 минут, тогда, как у больных с глиомами максимальная адгезия CD11β, + клеток отмечалась на 30-минуте инкубации. Адгезия к пластику мононуклеаров здоровых и больных изменяет фенотипическую характеристику этих клеток. Так, если субпопуляции CD3, CD8, CD16 лимфоцитов были на одном уровне до и после адгезии в обеих фракциях, то содержание макрофагов CD11β в прилипающей фракции увеличивалось у здоровых лиц с (6.5, ±1,1)% до (13,4 ±1,1)% после 90-минутной инкубации, а у больных с (8,8 ±1,7)% до (14,1 ±1,2)% - после 30 минутной инкубации. В обоих случаях происходило приблизительно двукратное увеличение содержания клеток, экспрессирующих CD11β рецепторы, что можно объяснить наличием предшественников этих клеток, которые при действии пластика начинают экспрессировать рецепторы, которые, возможно, были блокированы и после адгезии произошла их экспрессия. Длительная адгезия вызвала увеличение числа клеток, экспрессирующих молекулу CD45, участвующую в процессе активации и адгезии клеток [7].

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что адгезивная и цитотоксическая активность мононуклеаров периферической крови больных с глиомами головного мозга отличается от соответствующих значений активности здоровых лиц, а разделение клеток на пластике приводит к восстановлению ЦА мононуклеаров периферической крови у боль-

ных, что, по-видимому, может, свидетельствует о присутствии в крови этих больных супрессорных M2 макрофагов.

**ВЫВОДЫ**

1. У больных с глиомами мозга снижена цитотоксическая активность мононуклеаров и незначительно повышена их адгезивная активность по сравнению с мононуклеарами здоровых лиц.
2. Разделение мононуклеаров крови на прилипающие и не прилипающие к пластику фракции приводит к восстановлению ЦА клеток прилипающей фракции у больных с глиомами.
3. Макрофагальная фракция клеток больных с глиомами, экспрессирующая CD11 рецепторы имеет более высокую адгезивную способность, чем соответствующая фракция здоровых лиц
4. Инкубация мононуклеарных клеток на пластике в течение 30-90 минут приводит к увеличению фракции клеток, экспрессирующих CD11, CD45 рецепторы, ответственные за активацию и адгезивные свойства клеток.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Варианты функциональной активности регуляторных лимфоцитов у больных нейроонкологического профиля с различными сроками послеоперационной ремиссии / И.А.Гнедкова., О.Б. Горобец, Р.Ю.Яроцкий. [и др.].//Нейрохирургия: Респ. межвед. сб.-Киев; Здоровья, 1992.-Вып.25.-С.97-102.
2. Особенности иммунологических нарушений при глиомах головного мозга в период ремиссии /Н.И.Лисяный., И.А.Гнедкова., С.А.Бычкова [и др.], // Українск. нейрохірургічний журнал.-2004.-N.2.-С.55-61.

3. Пухлинно-асоційовані макрофаги в перспективі розробки метордів спрямованої проти-пухлинної терапії / Л.М. Сквіка., Г.В. Горбик., О.Г.Федорчук , В.В. Позур .// Цитология и генетика –. 2009.– №4.– С.71- 82
4. Mantovani A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes/ A.Mantovani.//Trends Immunol. – 2002.– Vol.23, №11.–P 549-555.
5. Пинегин Б.В. Макрофаги: свойства и функции / Б.В. Пинегин, М.И Карсонова // Иммунология.-2009, V.29.-№4.-С.241-247.
6. Лисяный Н.И., Активность специфических противоопухолевых иммунных реакций. у больніх злокачественніми глиомами мозга/ Н.И.Лисяный., И.А. Гнедкова, М.А.Гнедкова Активность специфических противоопухолевых иммунных реакций. у больніх злокачественніми глиомами мозга.// Імунологія та алергологія.– 2010, №2.– С.47-52.
7. Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties/ J.C. Rodrigues , G.C Gonzalez, LZhang., [etal.]//Neuro-onkology.-2010,V.12.- №4.-P.351- 365
8. Шпакова А.П. МТТ колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток / А.П. Шпакова, К.С.Павлова, Т.И.Бульчева] //Клиническая лабораторная диагностика.– 2000.–№2.–С.20-23.
9. Parney I.F., Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages/ I.F.Parney. ,J.S.Waldrон., А.Т.Parsa. // J.Neurosurg. 2009.-V.110, №3.-P572-582.

Таблица 1

**Адгезия мононуклеаров периферической крови больных и здоровых лиц на пластиковых чашках, в зависимости от длительности культивирования**

| Исследуемые группы | 30 минут               |                     | 60 минут     |          | 90 минут   |          |
|--------------------|------------------------|---------------------|--------------|----------|------------|----------|
|                    | Прилипающие клетки(ПР) | Неприлипающие (НПР) | ПР           | НПР      | ПР         | НПР      |
| Больные n=46       | 58,3±1,1*,**           | 31,0±2,1            | 44,1±5,1*,** | 44,8±6,2 | 36,5±5,1** | 52,0±2,1 |
| Здоровые n=20      | 52,1±3,1***            | 34,0±2,1            | 33,8±1,1*,** | 33,1±1,2 | 28,5±2,1** | 43,0±5,2 |

\*-достоверность отличий между значениями показателей одного типа клеток с различной длительностью культивирования P<0,01

\*\* - достоверность отличий между значениями показателей больных и доноров P<0,01

Таблиця 2

**Цитотоксическая активность прилипающей и неприлипающей фракции мононуклеаров периферической крови у больных глиомами и здоровых**

| Исследуемые группы       | Адгезия к пластику(%) | ЦА мононуклеаров | Культивирование минут ЦА мононуклеаров |              | Культивирование 90 минут ЦА мононуклеаров |              |
|--------------------------|-----------------------|------------------|--|--------------|---|--------------|
|                          |                       |                  | ПР                                     | НПР          | ПР  | НПР          |
| Больные глиомами<br>n=68 | 59,1±4,9              | 12,1±1,4*,**     | 36,1±2,1**                             | 19,2±3,6*    | 18,7±1,4                                  | 27,5±2,6*,** |
| здоровые<br>n=20         | 55,1±7,1              | 65,1±9,1*,**     | 35,5±7,1                               | 27,1±3,6*,** | 19,6±2,4**                                | 17,6±1,9*,** |

\* - достоверность отличий между группами больных и доноров P< 0,01

\*\* - достоверность отличий между показателями цельной и фракционированной популяциями клеток цельной и разделенной суспензии

Таблиця 3

**Субпопуляционный состав мононуклеаров крови больных глиомами краткосрочно культивированных на пластике**

| Наименование к дифференцировочных антигенов CD: | Мононуклеары периферической крови больных глиомами | 30 минут культивирования на пластике прилипающая |               | 90 минут культивирования на пластике |               |
|---|--|--|---------------|--------------------------------------|---------------|
|   | n=56   | прилипающая                                      | неприлипающая | прилипающая                          | неприлипающая |
| CD3   | 58,2±3,1   | 57,9±2,1   | 59,1±1,1      | 58,1±1,9                             | 55,6±1,4      |
| CD11  | 8,8±1,7*   | 14,1±1,2*  | 9,2±0,9       | 8,9±1,2                              | 15,1±1,1*     |
| CD14  | 9,8±2,9  | 9,9±3,9  | 9,7±1,8       | 9,2±1,2                              | 9,8±2,9       |
| CD14/CD11                                       | 0,95±0,05*   | 1,07±0,07  | 1,14±0,05     | 1,02±0,04                            | 1,0±0,01      |
| CD8   | 24,9±1,3   | 26,9±1,1   | 27,5±2,3      | 26,1±0,3                             | 26,9±1,2      |
| CD16  | 13,6±1,4   | 13,0±0,8   | 9,7±1,1       | 9,6±1,1                              | 9,5±1,8       |
| CD56  | 11,2±2,8*  | 12,0±0,8   | 5,9±1,1*      | 7,6±1,1                              | 14,6±1,8*     |
| CD45  | 36,6±1,9*  | 29,8±1,3*  | 31,3±2,4*     | 45,9±2,1*                            | 45,9±1,9*     |
| CD34  | 6,4±1,1*   | 2,5±0,9*   | 2,5±0,9       | 2,5±0,9*                             | 2,5±0,9*      |

\* - достоверность отличий между неразделенной и фракционированными фракциями клеток P<0,01

\*\* - достоверность отличий между показателями прилипающих и неприлипающих клеток.

Таблиця 4

**Субпопуляційний склад мононуклеарів крові і фракцій культивованих на пластичці здорових осіб**

| Найменування диференцірованих антигенів CD: | Мононуклеарні периферическої крові здорових осіб | 30 хвилин культивування на пластичці прилипаюча |              | 90 хвилин культивування на пластичці |              |
|---|--|---|--------------|--------------------------------------|--------------|
|   |  | прилипаюча                                      | неприлипаюча | прилипаюча                           | неприлипаюча |
| CD3   | 55,1±1,1   | 55,5±2,1  | 53,1±1,8     | 54,9±1,5                             | 55,6±2,1     |
| CD11  | 6,5±1,1*   | 8,3±1,1   | 12,1±1,3*    | 13,4±1,1*                            | 11,1±1,5*    |
| CD14  | 8,58±2,9   | 9,38±2,1  | 11,1±1,3     | 12,4±1,2                             | 10,1±2,1     |
| CD14/CD11                                   | 1,45±0,05*                                       | 1,12±0,05*                                      | 1,12±0,03*   | 1,22±0,04                            | 0,95±0,05*   |
| CD8   | 21,0±1,1*  | 29,3±1,2*                                       | 23,3±1,1     | 21,7±0,9                             | 25,0±1,4     |
| CD16  | 11,5±1,1   | 11,4±0,9  | 9,6±2,3      | 9,6±1,7                              | 9,5±2,1      |
| CD56  | 11,2±2,3   | 8,4±1,9   | 9,7±1,2      | 9,6±1,4                              | 9,5±1,1      |
| CD45  | 315±2,1*   | 29,1±2,8  | 313±3,4      | 33,5±2,3                             | 45,0±2,8*    |
| CD34  | 2,2±0,7*   | 3,2±0,9   | 4,1±0,9*     | 2,8±0,3**                            | 4,9±0,2*,**  |
| CD54  | 6,9±1,1*   | 4,9±1,2   | 8,0±1,4      | 10,9±1,2*,**                         | 6,8±0,7      |
| CD72  | 7,0±3,1  | 10,4±2,9  | 10,4±2,9     | 10,4±2,9                             | 10,4±2,9     |

\* - достовірність відмінностей між незділеною і фракціонованими фракціями клітин P<0,01

\*\* - достовірність відмінностей між показателями прилипаючих і неприлипаючих клітин.

**РЕЗЮМЕ**

**ЦИТОТОКСИЧНА І АДГЕЗИВНА АКТИВНІСТЬ МОНОНУКЛЕАРІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ ІЗ ГЛІОМАМИ**

*Лісяний М. І., Гнедкова І.О., Гнедкова М.О., Розуменко В. Д., Главацький О.Я., Шмельова Г. А., Малишева Т.А., Черненко О. Г.*

ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А.П. Ромоданова»

Вивчена цитотоксична і адгезивна активність периферических мононуклеарів у 98 хворих із гліомами різного ступеня злоякісності і 20 здорових осіб. Мононуклеарні периферическої крові прилипали (адгезія до пластички) впродовж 30 і 90 хвилин, після чого вивчали їх цитотоксичну активність (ЦА), по відношенню до алогенних пухлинних клітин. Встановлено, що у хворих на гліоми, приблизно в 5 разів знижена ЦА активність мононуклеарів і дещо підвищена їх адгезивна активність порівнянно із контролем. Виділення мононуклеарів крові на прилипаючі і не прилипаючі до пластички фракції впливає на відновлення ЦА клітин прилипаючої фракції (адгезивної) у пацієнтів із гліомами. Макрофагальна фракція клітин хворих на гліоми, яка експресує CD11 рецептори, має вищу адгезивну здатність, ніж у контролі. Інкубація мононуклеарів на пластичку впродовж 30-90 хвилин призводить до збільшення фракції клітин, які експресують CD11, CD45 рецептори, що зумовлюють адгезивні властивості клітин. Можна припустити, що відновлення ЦА моноцитів-макрофагів у хворих із гліомами після 30 хвилинної інкубації на пластичку може бути обумовлена сукупністю чинників серед яких можна виділити неспецифічну активацію рецепторів моноцитів-макрофагів негативно зарядженими полімерними молекулами пластички.

**SUMMARY**

**CYTOTOXICAL AND ADHESIVE ACTIVITY OF THE MONONUCLEARES PERIPHERAL BLOOD PATIENTS WITH GLIOMAS**

*Lisyany N.I., Gnedkova I.A., Gnedkova M.A., Rozumeenko V. D., Glavatsky A.JA., Shmeleva A.A., Malysheva T.A., Chernenko O.G.*

GD «Romodanov Neurosurgery Institute»

Comparative study of cytotoxic and adhesive activity of the peripheral mononuclears in 98 different grade gliomas patients and 20 healthy persons has been performed. The mononuclear cells of the peripheral blood were adhered on the plastic during in 30 and 90 minutes, and then was studied their cytotoxic activity (CA), with respect to allogenic tumor cells. Five times reduction of the CA of the mononuclears in patients with gliomas and insignificant raising of adhesive activity of the mononuclears in comparison activity with mononuclears of healthy persons was found. The macrophage cells fraction of patients with gliomas expressing the CD11 receptors had more high adhesive ability than corresponding fraction of the healthy persons. The incubation of mononuclear cells on plastic during in 30-90 minutes increased the fraction of cells expressing CD11. CD45 receptors, which are responsible for the activation and adhesive properties.

The results showed the restoration cytotoxic activity of the monocytes-macrophages in patients with gliomas may depends on unspecific activation of the receptors monocytes-macrophages by negatively charged plastic polymerous molecules.