

УДК: 612.017.1:591.881:616-092.9.259:616.15:616.831-006.484

ВПЛИВ СУПЕРНАТАНТУ ПРОГЕНІТОРНИХ НЕЙРОКЛІТИН ЩУРА НА ЕКСПРЕСІЮ АНТИГЕНІВ HLA МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ТА КЛІТИНАМИ ПУХЛИН ХВОРИХ З ГЛІОМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ IN VITRO

ЛЮБИЧ Л.Д.

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

Актуальним напрямом сучасної онкоімунології є подолання механізмів уникнення пухлинами контролю з боку імунної системи та їх супресивного впливу на імунокомпетентні клітини [1,2]. Відомо, що при гліомах – найбільш загальних первинних пухлинах мозку, які характеризуються інфільтративним ростом та резистентністю до лікування і мають несприятливий прогноз для життя пацієнтів, виявляються зміни у всіх ланках імунітету [3]: відносна та абсолютна лімфопенія, знижений вміст CD4⁺-, CD8⁺-, CD16⁺-лімфоцитів, HLA-DR-клітин, гальмування проліферативної здатності лімфоцитів, зниження секреції ефекторних цитокінів. Поряд із зниженням кількості та функції CD4⁺-, CD8⁺-клітин, підвищується кількість Т-регуляторних CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ клітин, що продукують імуноінгібуючі медіатори [4].

Втрата здатності до експресії молекул головного комплексу гістосумісності (major histocompatibility complex – MHC; human leucocyte antigens – HLA) та компонентів механізму процесингу антигенів (antigen-processing machinery – APM) є однією з патогенетичних ланок розвитку онкологічних захворювань [5,6]. При гліомах, особливо злоякісних, відбувається часткова або повна втрата експресії антигенів I та/або II класу HLA [5,7], зниження експресії транспортних молекул LMP2, TAP1 та β2-мікроглобуліну [6]. З іншого боку, клітини гліобластом, а також клітини мікроглії/макрофагів, що інфільтрують пухлину, експресують неklasичні молекули HLA-G та HLA-E з імуномодуючою дією [8,9]. Показано, що при гліомах клітинами пухлини продукується IL-10, який чинить імуносупресивну дію на формування локального імунітету за рахунок зниження експресії антигенів MHC II класу (DR) на моноцитах; інгібіції Т-клітинної проліферації і алоцитолітичної активності лімфоцитів [1]. Зниження рівня експресії антигенів II класу MHC є однією з причин відсутності протипухлинної активності CD4⁺Т-лімфоцитів.

Для посилення ефективності клітинної імунотерапії гліом необхідно зробити гліомні клітини більш чутливими для цитолізу алореактивними цитотоксичними лімфоцитами (ЦТЛ). З цією метою використовують прозапальні цитокіни IFN-γ, IL-1β, TNF-α, які здатні підвищувати

експресію антигенів MHC I та II класу in vitro та in vivo на клітинах гліосаркоми 9L, медулобласти, злоякісної гліоми, гліом ліній RG2, C6, 9L [10,11]. Підвищення експресії антигенів MHC I та II класу in vivo супроводжувалось зростанням тривалості виживання тварин і зменшенням розмірів пухлин, зростанням інфільтрації пухлини CD4⁺ та CD8⁺Т-клітинами, кращим розпізнаванням аlogenними ЦТЛ у цитотоксичних тестах.

Одним із актуальних підходів у терапії гліом мозку є використання нейральных прогеніторних клітин (НПК) та їх продуктів, що можуть проявляти протипухлинні властивості [12-17]. Одним із можливих механізмів реалізації протипухлинних властивостей НСК, поряд з іншими, є індукція ефективної імунної відповіді проти внутрішньомозкових пухлин. В попередніх дослідженнях нами встановлено протипухлинну дію супернатанту НПК щура (СНК) на культури гліом людини [18,19] та при введенні щурам з експериментальною гліомою 101.8A [20]. Метою даної роботи було дослідити вплив СНК щура на експресію антигенів гістосумісності в мононуклеарах периферичної крові (МНПК) та у клітинах пухлин хворих з гліомами головного мозку.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом слугували МНПК хворих з гліомами головного мозку (n=25), МНПК осіб групи порівняння (умовно здорові особи без онкологічного захворювання, n=16), фрагменти пухлин головного мозку, видалених у хворих під час оперативного втручання (n=25), зразки білої (n=7) та сірої (n=3) речовини головного мозку. При гістологічній верифікації діагнозу у хворих діагностовано 5 гліом 2 ступеня злоякісності, 9 гліом 3 ступеня злоякісності, 11 гліобластом (4 ступінь злоякісності).

МНПК виділяли центрифугуванням у градієнті фікол-верографіну (d=1,077) при 1500 об/хв протягом 30 хв, потім двічі відмивали забуференим фізрозчином рН 7,2-7,4. Життєздатність клітин визначали за проникністю плазматичної мембрани для 0,2% трипанового синього («Merch», Німеччина) [21].

Клітинні суспензійні культури гліом отримували з пухлин, видалених у хворих оперативним шляхом, здійснювали багаторазове ресуспенду-

вання за допомогою шприца з товстою голкою, з наступним відмиванням клітин забуференим фізрозчином рН 7,2-7,4 двічі. Життєздатність клітин у суспензії визначали у стандартному цитотоксичному тесті з 0,2% трипановим синім («Merch», Німеччина) [21].

Отримання супернатанту прогеніторних нейроклітин щура (СНК). Для отримання СНК використовували суспензію, виготовлену з тканини мозку щура на 12-16-у добу гестації (E12-16). Нативну тканину мозку у фізіологічному розчині звільняли від оболонок, переносили в середовище DMEM (Sigma, Німеччина) і ресуспендували за допомогою шприца з товстою голкою. Життєздатність клітин у суспензії визначали у стандартному цитотоксичному тесті з 0,2% трипановим синім («Merch», Німеччина) [21]. До отриманої клітинної суспензії (з концентрацією клітин $6,0 \times 10^6$ /мл) додавали конканавалін А (0,10 мг/мл) та інкубували 2 год в CO₂-інкубаторі при температурі (37,0±0,5)°C, постійній вологості 95% та 5% CO₂. Після інкубації клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відмивали у середовищі DMEM, до осаду клітин додавали свіже середовище DMEM, ресуспендували та інкубували в тих же умовах протягом 24 год. Після інкубації клітини повторно осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відбирали супернатант, визначали у ньому концентрацію білка, стандартизували до концентрації 0,1 мг/мл, аліквотизували і зберігали при (-20±0,5) °C.

Склад отриманого препарату СНК досліджували за допомогою електрофорезу у 1,5% ПААГ [22]. За даними електрофореграми, препарат СНК містив дві фракції білків : 67 кДа – 55%; 46 кДа – 44%.

Вивчення дії СНК in vitro. Препарат у кількості 0,02 та 0,10 мг/мл додавали до суспензії виділених МНПК та клітин пухлини і інкубували протягом 24 год. До та після інкубації з СНК у суспензії визначали експресію антигенів HLA-A,B,C, HLA-DR та вираховували різницю показників (Δ , %).

Дослідження експресії антигенів HLA. Експресію антигенів HLA-A,B,C (антигени гістосумісності I класу) та HLA-DR (антиген гістосумісності II класу) на клітинах визначали непрямим імуофлюоресцентним методом за допомогою моноклональних антитіл (ООО «Сорбент», Москва). Клітинні суспензії аналізували перед початком та після інкубації з СНК на проточному імуоцитофлуориметрі FACS Calibur (США) згідно рекомендацій [23].

Визначення експресії мРНК генів HLA (HLA-A1a, HLA-Dra1, HLA-DQb1, СІІТА). Експресію мРНК генів HLA визначали за допомогою методу RT-PCR. Для цього із суспензій клітин (5×10^6 клітин у пробі) виділяли РНК за допомогою набору «Trizol RNA Prep 100» (ООО «Лабораторія

Изоген», Росія), переводили РНК (із розрахунку 1 мкг на пробу) у кДНК в реакції зворотної транскрипції («GenePack RT-PCR Core», ООО «Лабораторія Изоген», Росія). Чистоту отриманих препаратів РНК перевіряли за допомогою PCR із використанням праймерів, специфічних до гена β-актину людини, вносячи в реакцію РНК без попереднього етапу зворотної транскрипції (прямий 5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3', зворотний 5'-TCGGCCGTGGTGGTGAAGC-3') (рис.1,а).

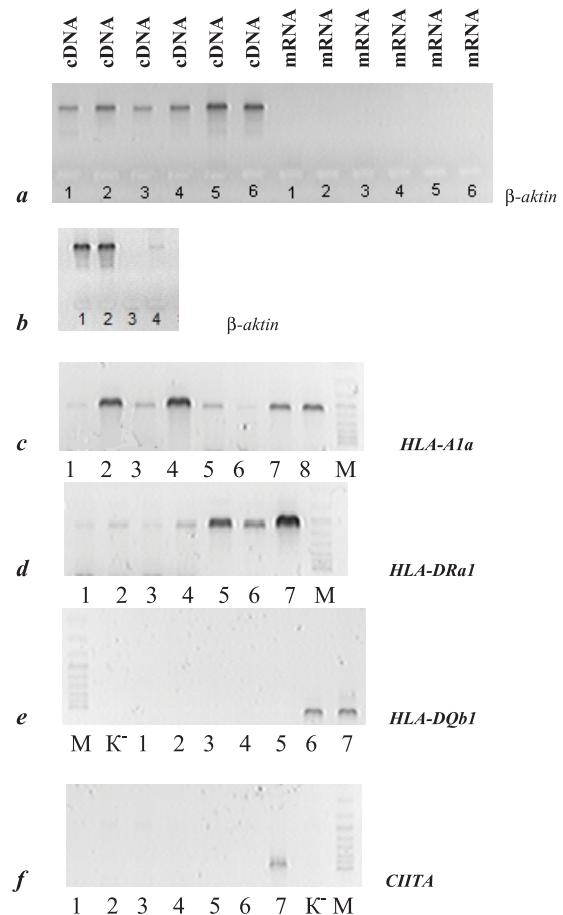


Рис. 1. RT-PCR аналіз експресії генів гістосумісності (1-6 – номери зразків, М – маркер молекулярних мас (DNA 50-500, Fermentas, Литва), К- – негативний контроль):

- a – електрофорез PCR-продуктів (220 п.н.) із праймерами для β-актин,
- b – електрофорез PCR-продуктів (220 п.н.) із праймерами для β-актин: 1 – РНК (містить домішок ДНК); 2 – кДНК, синтезована з РНК зразка 1; 3 – домішок ДНК у зразку РНК 1 інактивовано за допомогою ДНКаз (DNase I, «Fermentas», Литва); 4 – кДНК, синтезована з РНК зразка 1, інактивовано за допомогою ДНКаз;
- c – електрофорез PCR-продуктів (205 п.н.) із праймерами для HLA-A1a,
- d – електрофорез PCR-продуктів (272 п.н.) із праймерами для HLA-DRa1,
- e – електрофорез PCR-продуктів (515 п.н.) із праймерами для HLA-DQb1,
- f – електрофорез PCR-продуктів (470 п.н.) із праймерами для СІІТА.

При наявності домішку ДНК проводили її

інактивацію за допомогою ДНКаз (DNase I, «Fermentas», Литва) (рис.1, b).

PCR проводили з використанням кДНК, 0,2 мкМ праймерів (синтетичних олігонуклеотидів («SYNTOL», Росія): HLA-A1a прямий 5'-GGACCAGGAGACACGGAATA-3', зворотний 5'-CTCGTTTCAGGGCGATGTAAT-3'; HLA-DRa1 прямий 5'-AAAGCGCTCCAATACTCCGA-3', зворотний 5'-ACCSTGCAGTCGTAAACGTCC-3'; HLA-DQb1 прямий 5'-GTCTTGTGACCAGATACATCT-3', зворотний 5'-TCTGGCAGATTCAGACTGAG-3'; СІІТА прямий 5'-CAAGTCCCTGAAGGATGTGGA-3', зворотний 5'-ACGTCCATCACCCGGAGGGAC-3') та набору реагентів «GenePack RT-PCR Core» (ООО «Лаборатория Изоген», Росія) протягом 40 циклів з параметрами: 95°C – 15с, 58-62°C – 20с, 72°C – 15с в ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технология», Росія). Результати PCR аналізували за допомогою електрофорезу у 1,5% агарозному гелі з використанням спеціалізованої системи для обробки відеозображень «Biotest-A». Наявність мРНК вважали доведеним у тих зразках, у яких в результаті електрофорезу в 1,5% гелі спостерігалась світна смуга заданої довжини при

відсутності такої смуги у негативному контролі (рис.1, c, d, e, f). З метою стандартизації отриманих результатів проводили RT-PCR з використанням праймерів, специфічних до гена β-актина людини, що експресується конститутивно. Кількісну обробку отриманих зображень проводили за допомогою програми «Biotest-A»; кількісне значення позитивної проби розраховували як світність даної проби, поділену на світність аналогічної проби амплікону β-актину, приймаючи останню за 1, та виражали в умовних одиницях (ум.од.).

Статистичну обробку даних проводили із використанням пакету статистичних програм «Statistica 5,0», достовірність різниці оцінювали із застосуванням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вплив СНК на експресію антигенів гістосумісності МНПК. При дослідженні впливу СНК на експресію антигенів HLA МНПК встановлено, що СНК щура суттєво не впливав на експресію HLA-A, B, C та HLA-DR на протеїновому рівні МНПК групи порівняння (табл.1).

Таблиця 1.

Оцінка впливу СНК щура (E12-16) на експресію антигенів HLA у МНПК хворих з гліомами головного мозку людини в залежності від ступеня анаплазії

Клітини	Концентрація СНК, мг/мл	HLA-A, B, C+			HLA-DR+		
		початковий показник	+ СНК	Δ, %	початковий показник	+ СНК	Δ, %
МНПК хворих з пухлинами головного мозку (n=25)	0,02	5,34+2,61	4,94+1,68 *2	-0,40+1,90	5,05+1,65 *8	4,43+1,20 *11	-0,62+1,45
	0,10		4,65+1,11 *3	-0,69+2,73		4,97+1,46	-0,08+1,76
МНПК хворих з гліомами 2 ст.зл. (n=5)	0,02	6,65+2,03	5,55+0,17 *4	-1,1+1,87	4,70+0,63 *9	6,68+0,22 ^3,4	1,98+0,42 ^5,6
	0,10		6,08+0,28 ^1,2	-0,58+2,32		5,63+0,08	0,93+0,55
МНПК хворих з гліомами 3 ст.зл. (n=9)	0,02	6,46+2,39	5,45+2,58	-1,01+2,34	5,29+2,39	4,67+1,28 *12 ^3	-0,62+1,27^5
	0,10		3,88+0,60*6 ^1	-2,59+1,99		4,55+1,51	-0,74+1,51
МНПК хворих з гліомами 4 ст.зл. (n=11)	0,02	3,89+1,69 *1	4,21+1,95 *5	0,32+1,62	5,12+1,69 *10	3,67+1,06 *13 ^4 #1	-1,45+1,40 ^6 #2
	0,10		4,43+0,92 *7 ^2	0,54+1,08		5,07+1,47 *1	-0,05+1,40 #2
МНПК контрольної групи (n=16)	0,02	10,12+1,79*1	9,41+1,14 *2,4,5	-0,71+1,31	10,01+1,24 *8,9,10	10,32+1,92 *11,12,13	0,31+1,36
	0,10		10,52+1,72 *3,6,7	0,41+1,09		9,46+2,27	-0,55+1,03

Примітка: * - достовірність різниці відносно відповідного показника контрольної групи: *1 (p<0,042); *2 (p<0,0041); *3 (p<0,023); *4 (p<0,0074); *5 (p<0,004); *6 (p<0,014); *7 (p<0,021); *8 (p<0,042); *9 (p<0,039); *10 (p<0,045); *11 (p<0,016); *12 (p<0,02); *13 (p<0,01); ^ - достовірність різниці між відповідними показниками груп: ^1 (p<0,018); ^2 (p<0,05); ^3 (p<0,014); ^4 (p<0,0011); ^5 (p<0,026); ^6 (p<0,011); # - достовірність різниці між відповідними показниками при дії різних доз СНК в межах групи: #1 (p<0,025); #2 (p<0,025).

Суспензії МНПК хворих з гліомами містили в середньому вдвічі меншу кількість клітин, що експресують антигени гістосумісності, ніж суспензії МНПК умовно здорових осіб; кількість HLA-DR+ клітин у суспензіях МНПК хворих з гліомами була достовірно меншою, ніж у суспензіях МНПК групи порівняння ($p < 0,042$) (табл. 1). Серед МНПК хворих з гліомами найменший відсоток HLA-A, B, C+ клітин містили суспензії МНПК хворих з гліомами 4 ст.зл. (достовірно нижчий ($p < 0,042$) за контроль); а найменший відсоток HLA-DR+ клітин – суспензії МНПК хворих з гліомами 2 ст.зл. (достовірно нижчий ($p < 0,039$) у порівнянні з контролем); суспензії МНПК хворих з гліобластомами за цим показником також достовірно відрізнялись від контролю ($p < 0,039$) (табл. 1).

В середньому СНК щура несуттєво впливав на експресію антигенів HLA на протеїновому рівні МНПК хворих з гліомами: відсоток HLA-A, B, C+ та HLA-DR+ клітин у суспензіях МНПК дещо зменшувався, залишаючись достовірно зниженим відносно показників МНПК умовно здорових осіб ($p < 0,0041$ та $p < 0,023$ відповідно за впливу СНК у концентраціях 0,02 мг/мл та 0,10 мг/мл на експресію HLA-A, B, C+; $p < 0,016$ за впливу СНК у концентрації 0,02 мг/мл на експресію HLA-DR+) (табл. 1).

СНК щура суттєво не впливав на експресію антигенів HLA-A, B, C МНПК хворих з гліомами 2 ступеня злоякісності: відсоток HLA-A, B, C+ клітин у суспензіях МНПК дещо зменшувався, залишаючись достовірно зниженим відносно показників МНПК умовно здорових осіб ($p < 0,0074$ при дії 0,02 мг/мл СНК), проте достовірно перевищуючи відсоток HLA-A, B, C+ клітин у суспензіях МНПК хворих з гліомами 3 ступеня злоякісності та гліобластомами ($p < 0,042$ та $p < 0,0041$ відповідно при дії 0,10 мг/мл СНК) (табл. 1). На відміну від цього, відсоток HLA-DR+ клітин у суспензіях МНПК хворих з гліомами 2 ступеня злоякісності за впливу досліджуваного препарату зростав: СНК у концентрації 0,02 мг/мл достовірно збільшував частку HLA-DR+ МНПК у хворих з гліомами 2 ступеня злоякісності, порівняно з МНПК хворих з гліомами 3 ступеня злоякісності та гліобластомами ($p < 0,014$ та $p < 0,011$ відповідно), крім того приріст (Δ , %) HLA-DR+ МНПК у суспензійних культурах хворих з гліомами 2 ступеня злоякісності після інкубації з СНК (0,02 мг/мл) достовірно відрізнявся від відповідного показника МНПК хворих з гліомами 3 ступеня злоякісності та гліобластомами ($p < 0,004$, $p < 0,014$ відповідно).

За умов дії СНК на суспензії МНПК хворих з гліомами 3 ступеня злоякісності частка клітин, що експресують антигени гістосумісності, зменшувалась (табл. 1): СНК достовірно знижував відсоток HLA-A, B, C+ (0,10 мг/мл) та HLA-

DR+ (0,02 мг/мл) клітин у суспензіях хворих з гліомами 3 ступеня злоякісності, порівняно з МНПК умовного контролю ($p < 0,014$ та $p < 0,02$ відповідно).

За умов дії СНК на суспензії МНПК хворих з гліобластомами відсоток клітин, що експресують антигени гістосумісності I класу, дещо зростав, залишаючись проте достовірно меншим за контрольні показники ($p < 0,004$ та $p < 0,021$ відповідно за умов дії 0,02 та 0,10 мг/мл СНК) (табл. 1). Відсоток клітин, що експресують антигени гістосумісності II класу, у суспензіях хворих з гліобластомами за впливу 0,02 мг/мл СНК знижувався ($p < 0,014$ порівняно з контролем), тоді як за впливу 0,10 мг/мл СНК – не змінювався і достовірно перевищував відповідний показник за впливу 0,02 мг/мл СНК ($p < 0,025$).

При дослідженні експресії генів HLA у МНПК групи порівняння за допомогою напівкількісної RT-PCR встановлено, що на рівні мРНК ген HLA-A1a експресувався в 3 зразках (18,8% проаналізованих зразків), HLA-Dra1 – у 5 зразках (31,3%), HLA-DQb1 – у 3 зразках (18,8%), ген клітинного трансактиватору II типу СІІТА – у 2 зразках (12,5%) (рис.2). За впливу 0,02 мг/мл СНК щура зафіксовано зростання експресії гену HLA-Dra1 у 4 зразках МНПК групи порівняння (25%); за впливу 0,10 мг/мл СНК зростала експресія генів HLA-A1a у 2 зразках (12,5%) та HLA-Dra1 у 5 зразках (31,3% проаналізованих зразків МНПК групи порівняння (рис.2); на експресію інших досліджених генів впливу СНК щура не виявлено.

У МНПК хворих з гліомами експресію гену HLA-A1a на рівні мРНК зафіксовано у 31,3% досліджених зразків, HLA-Dra1 – у 62,5% зразків (рис.3). За впливу 0,02 та 0,10 мг/мл СНК щура суттєвої зміни експресії вказаних генів не виявлено, за виключенням 2 зразків, у одному з яких за умов впливу 0,10 мг/мл СНК знижувалась експресія HLA-A1a, а в другому - HLA-Dra1 (рис.3).

Вплив СНК на експресію антигенів гістосумісності клітинами гліом головного мозку.

Встановлено, що у суспензіях клітин гліом кількість HLA-A, B, C+ клітин, що експресують антигени гістосумісності I класу, та HLA-DR+ клітин, що експресують антигени гістосумісності II класу, становила в середньому 5%; при цьому у суспензіях гліом 2 ступеня злоякісності їх кількість була вищою, ніж у суспензіях гліом 3 та 4 ступеня злоякісності (табл.2). Відсоток HLA-DR+ клітин у суспензіях гліом 2 ступеня злоякісності достовірно перевищував відповідний показник у суспензіях гліом 3 ступеня злоякісності та гліобластом ($p < 0,023$ та $p < 0,016$ відповідно).

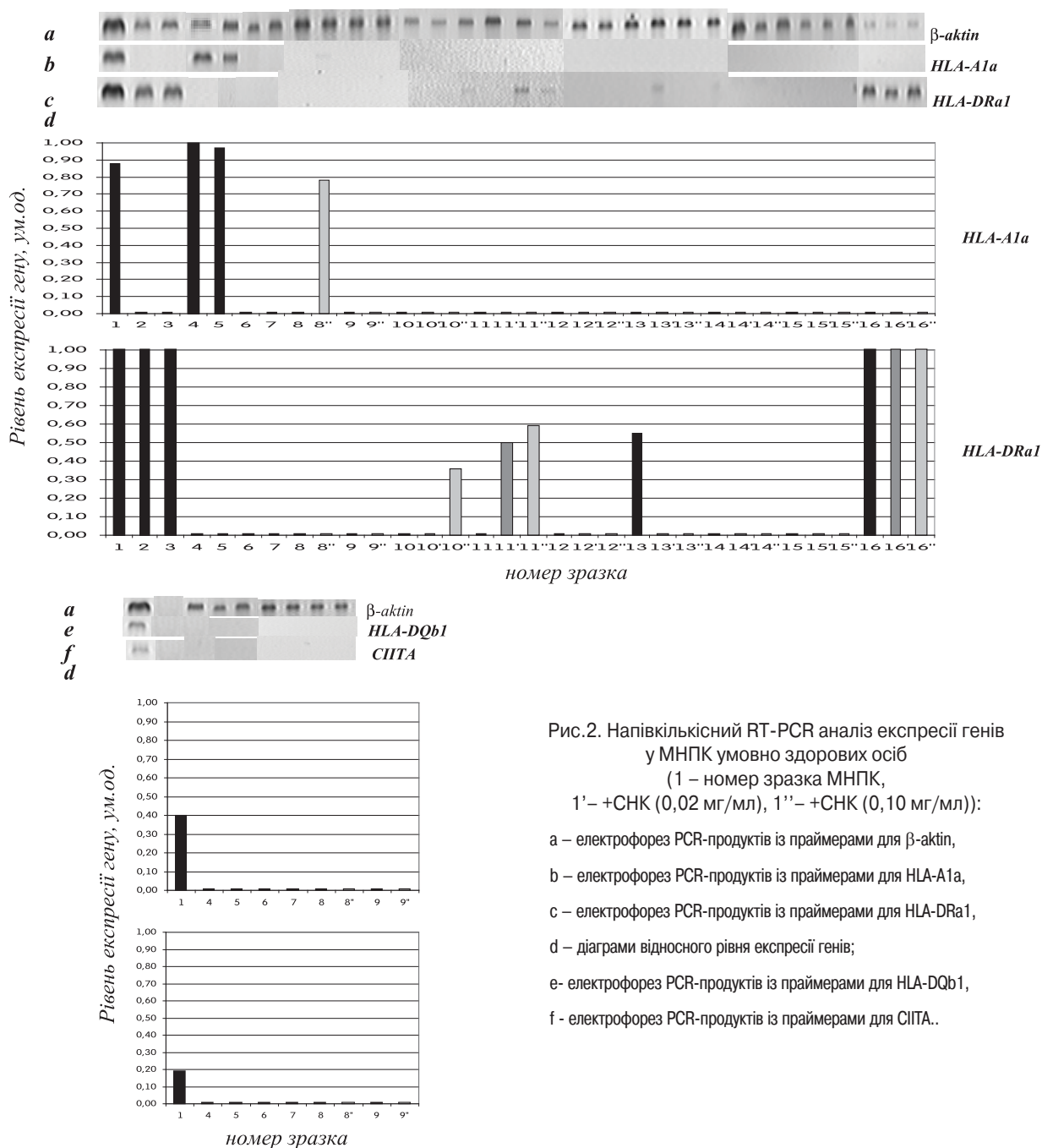


Рис.2. Напівкількісний RT-PCR аналіз експресії генів у МНПК умовно здорових осіб (1 – номер зразка МНПК, 1' – +СНК (0,02 мг/мл), 1'' – +СНК (0,10 мг/мл)):
 а – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для β -актин,
 б – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-A1a,
 с – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-DRa1,
 д – діаграми відносного рівня експресії генів;
 е- електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-DQb1,
 ф - електрофорез PCR-продуктів із праймерами для CIITA..

Таблиця 2.

Оцінка впливу СНК щура на експресію антигенів HLA у клітинах пухлин головного мозку хворих з гліомами різного ступеня анаплазії, %

Гістологічний тип гліом	Концентрація препарату, мг/мл	HLA-A,B,C+			HLA-DR+		
		початковий показник	+ СНК	Δ , %	початковий показник	+ СНК	Δ , %
Гліоми (n=25)	0,02 мг	5,05+1,73	6,93+2,39	1,88+2,35	5,11+1,49	6,37+1,43	1,26+1,69
	0,10 мг		6,35+1,86	1,30+2,10		5,95+1,46	0,84+1,74
гліоми 2 ст.зл. (n=5)	0,02 мг	6,02+1,43	7,12+2,94	1,1+2,33	7,10+0,65 ^2,3	7,10+1,63	0,00+0,98
	0,10 мг		7,97+1,57	1,95+0,98		7,78+2,48	0,68+2,26
гліоми 3 ст.зл. (n=9)	0,02 мг	4,45+0,95	5,49+0,42 ^1	1,04+1,05	4,84+0,24 ^2	5,82+1,27	0,98+1,60
	0,10 мг		6,41+2,09	1,96+2,94		5,19+0,91	0,36+2,08
Гліобластоми (4 ст.зл.) (n=11)	0,02 мг	5,73+2,28	8,23+0,18 ^1	2,50+1,85 #1	4,49+0,59 ^3 &1,2	6,36+0,49 &1	1,87+0,96
	0,10 мг		5,25+1,85	-0,48+0,84 #1		5,90+0,27 &2	1,41+0,19

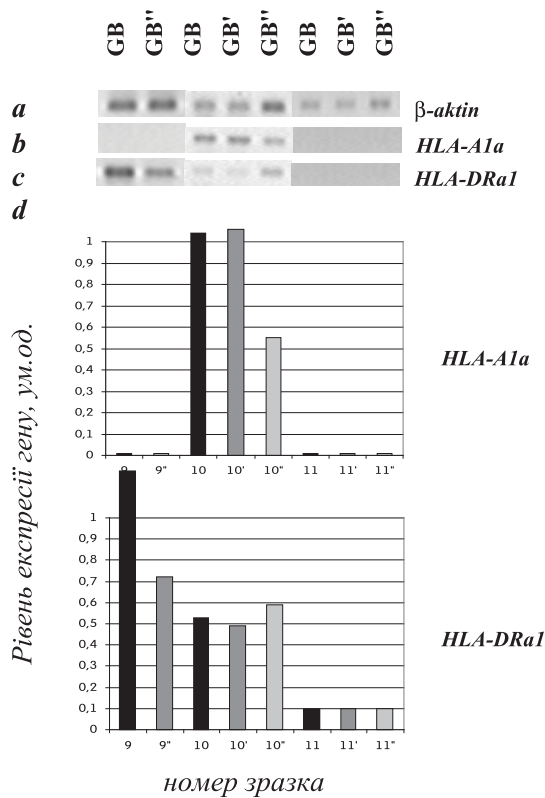


Рис.3. Напівкількісний RT-PCR аналіз експресії генів у МНПК хворих з гліомами (GB – гліобластома (4 ступінь злоякості); 1 – номер зразка МНПК, 1' - +СНК (0,02 мг/мл), 1'' - +СНК (0,10 мг/мл)):

- a – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для β -aktin,
- b – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-A1a,
- c – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-DRA1,
- d – діаграми відносного рівня експресії генів

За умов впливу СНК в обох концентраціях через 24 год кількість HLA-A,B,C+ та HLA-DR+ клітин у суспензійних культурах гліом дещо зростала. Аналіз показників в залежності від ступеня злоякості пухлини (табл.2) показав, що СНК щура збільшував кількість HLA-A,B,C+ (0,02, 0,10 мг/мл) та HLA-DR+ (0,10 мг/мл) клітин у суспензійних культурах гліом 2 ступеня злоякості; а також збільшував кількість HLA-A,B,C+ (0,02, 0,10 мг/мл) та HLA-DR+ (0,02, 0,10 мг/мл) клітин у суспензійних культурах гліом 3 ступеня злоякості.

Найбільш значуще СНК впливав на суспензійні культури гліобластом: в концентрації 0,02 мг/мл СНК достовірно підвищував відсоток HLA-A,B,C+ клітин у суспензійних культурах гліобластом у порівнянні з культурами гліом 3 ступеня злоякості ($p < 0,022$); приріст HLA-A,B,C+ клітин у суспензійних культурах гліобластом за умов впливу 0,02 мг/мл СНК достовірно перевищував відповідний показник у суспензіях за умов впливу 0,10 мг/мл СНК ($p < 0,021$). За умов дії СНК у суспензійних культурах гліобластом достовірно зростає відсоток HLA-DR+ клітин ($p < 0,038$ та $p < 0,026$ відповідно при дії 0,02 та 0,10 мг/мл СНК) (табл.2).

У зразках гліом експресію гену HLA-A1a на рівні мРНК зафіксовано у 6 зразках (24,0% досліджених зразків, з них 2 – астроцитоми 2 ступеня злоякості, 4 – гліобластоми), HLA-Dra1 – у 15 зразках (60,0%, з них 3 – астроцитоми 2 ступеня злоякості, 6 – анапластичні астроцитоми 3 ступеня злоякості, 7 – гліобластоми), експресію генів HLA-DQB1 та СІІТА не зареєстровано (рис.4). За впливу 0,02 мг/мл СНК щура експресія HLA-A1a зростала в 2 зразках гліобластом, в 1 – зменшувалась; експресія HLA-Dra1 зростала в 1 зразку астроцитоми 2 ступеня злоякості та у 8 зразках гліобластом; експресія HLA-DQB1 зростала у 5 зразках гліобластом, але зменшувалась у 1 зразку астроцитоми 2 ступеня злоякості; зміни експресії СІІТА не виявлено. За впливу 0,10 мг/мл СНК щура експресія HLA-A1a зростала в 9 зразках (36,0%, з них: 2 – астроцитоми 2 ступеня злоякості, 2 – анапластичні астроцитоми 3 ступеня злоякості, 5 – гліобластоми), в 1 зразку гліобластоми – зменшувалась; експресія HLA-Dra1 зростала у 18 зразках (72,0%, з них: 4 – астроцитоми 2 ступеня злоякості, 7 – анапластичні астроцитоми 3 ступеня злоякості, 7 – гліобластоми), в 1 зразку астроцитоми 2 ступеня злоякості – зменшувалась; експресія HLA-DQB1 зростала в 1 зразку астроцитоми 2 ступеня злоякості та 1 зразку анапластичної астроцитоми 3 ступеня злоякості; експресія СІІТА зростала в 1 зразку анапластичної астроцитоми 3 ступеня злоякості.

З метою порівняння ми дослідили експресію вказаних генів на рівні мРНК у зразках білої та сірої речовини головного мозку (рис.5). За нашими даними, ген HLA-A1a експресувався у 2 (28,6%) зразках білої речовини та 1 (33,3%) зразку сірої речовини головного мозку; HLA-Dra1 – у 4 (57,1%) зразках білої та 3 (100,0%) зразках сірої речовини; експресія HLA-DQB1 – у 1 (14,3%) зразку білої речовини, у зразках сірої речовини не зареєстрована; ген СІІТА експресувався у 1 (14,3%) зразку білої речовини та 1 (14,3%) зразку сірої речовини головного мозку.

ОБГОВОРЕННЯ

В результаті наших досліджень встановлено, що суспензії свіжовиділених МНПК хворих з гліомами містили вдвічі меншу кількість клітин, які експресують антигени гістосумісності, порівняно з МНПК умовно здорових осіб. Найменший відсоток HLA-A,B,C+ клітин містили суспензії МНПК хворих з гліомами 4 ступеня злоякості, а найменший відсоток HLA-DR+ клітин - суспензії МНПК хворих з гліомами 2 ступеня злоякості. Це узгоджується з даними дослідження [24], згідно яких у моноцитах хворих з гліобластомами була значно знижена експресія HLA-ABC, HLA-DR та знижена здатність диференціюватись у зрілі дендритні клітини.

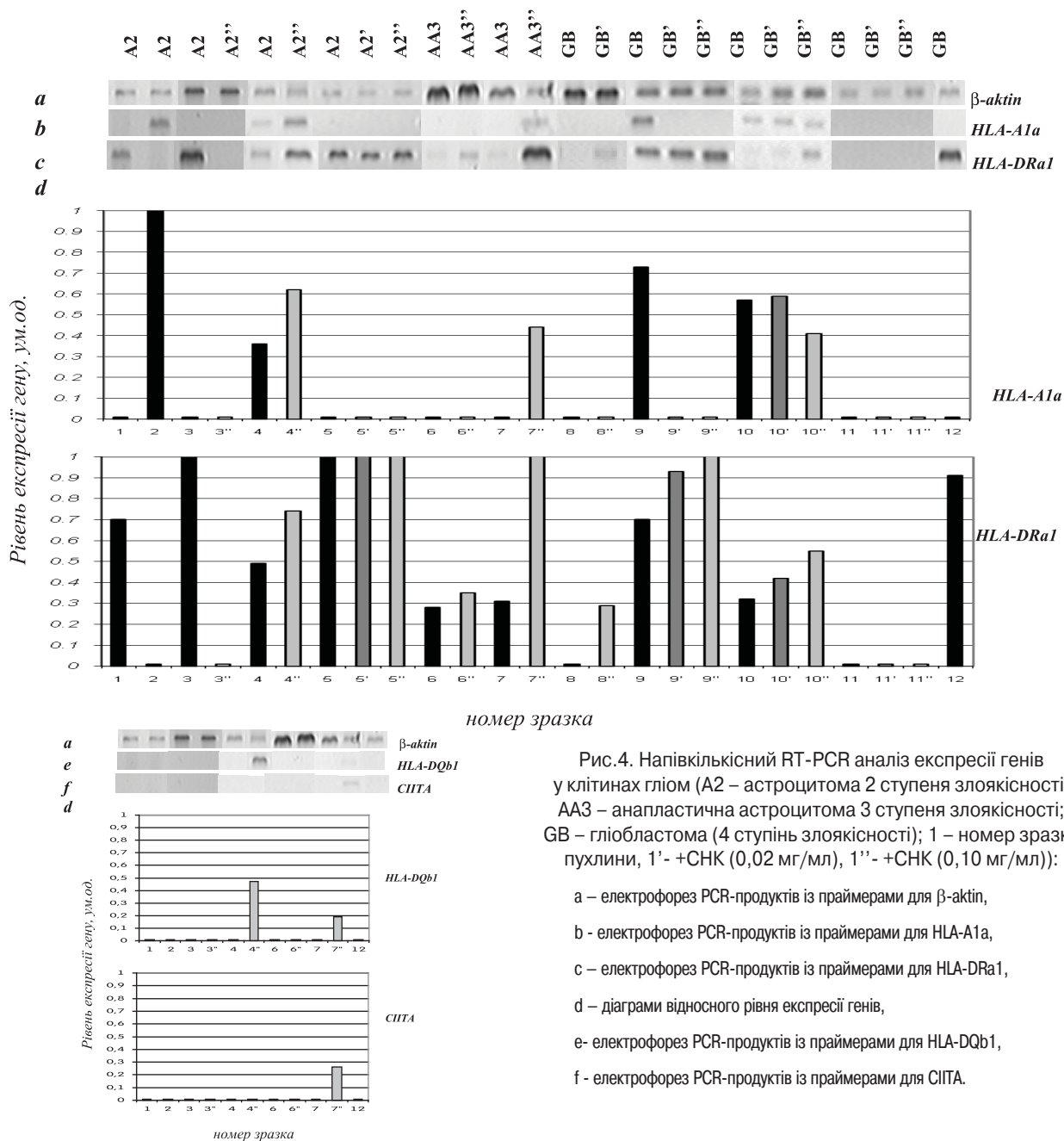


Рис.4. Напівкількісний RT-PCR аналіз експресії генів у клітинах гліом (A2 – астроцитомі 2 ступеня злоякісності; AA3 – анапластична астроцитомі 3 ступеня злоякісності; GB – гліобластома (4 ступінь злоякісності); 1 – номер зразка пухлини, 1' - +СНК (0,02 мг/мл), 1'' - +СНК (0,10 мг/мл)):

- а – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для β -aktin,
- б - електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-A1a,
- с – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-DRa1,
- д – діаграми відносного рівня експресії генів,
- е- електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-DQb1,
- ф - електрофорез PCR-продуктів із праймерами для CIITA.

На відміну від експресії на протеїновому рівні, на рівні мРНК ми не зафіксували зниження експресії досліджуваних генів HLA: HLA-A1a був експресований у 18,8% проаналізованих зразків МНПК контрольної групи і у 31,3% зразків МНПК хворих з гліомами; HLA-Dra1 – у 31,3% зразків МНПК групи порівняння і 62,5% зразків МНПК хворих з гліомами.

У суспензіях свіжовиділених клітин гліом кількість HLA-A,B,C+ клітин, що експресують антигени гістосумісності I класу, та HLA-DR+ клітин, що експресують антигени гістосумісності II класу, становила в середньому 5%. Згідно даних, отриманих нами раніше [25], клітини ольфакторної цибулини – утворення в головному мозку, що містить регіональні клітини-попередники зрілого мозку – містили в середньому 5% HLA-

A,B,C+ клітин та 10% HLA-DR+ клітин, на основі чого, на нашу думку, можна побічно судити про зниження експресії антигенів гістосумісності II класу клітинами гліом головного мозку. При цьому в суспензіях гліом 2 ступеня злоякісності кількість HLA-DR+ клітин була вищою, ніж у суспензіях гліом 3 та 4 ступеня злоякісності.

Отримані результати узгоджуються з літературними даними про те, що при гліомах, особливо злоякісних, відбувається часткова або повна втрата експресії антигенів I та/або II класу HLA [5,7,26]. Зокрема, за даними [26], клітини 18 ліній первинних гліом експресували високі рівні антигенів I класу HLA-A,B,C, але експресія антигенів II класу HLA-DR була відсутня. На матеріалі 88 зразків злоякісних астроцитарних пухлин [5] показано, що антигени HLA I класу були відсутні

в 50% із 47 гліобластом і в 20% із 18 астроцитом 2 ступеня злоякісності. Антиген HLA-A2 був відсутній у 80% з 24 гліобластом і у 50% з 12 астроцитом 2 ступеня злоякісності. Втрата антигенів HLA I класу значно корелювала із ступенем злоякісності пухлин. Одним із пояснень зниження

експресії антигенів MHC II класу (DR), що є однією з причин відсутності протипухлинної активності CD4+Т-лімфоцитів, може бути продукція клітинами гліом IL-10, який чинить імуносупресивну дію на формування локального імунітету [1].

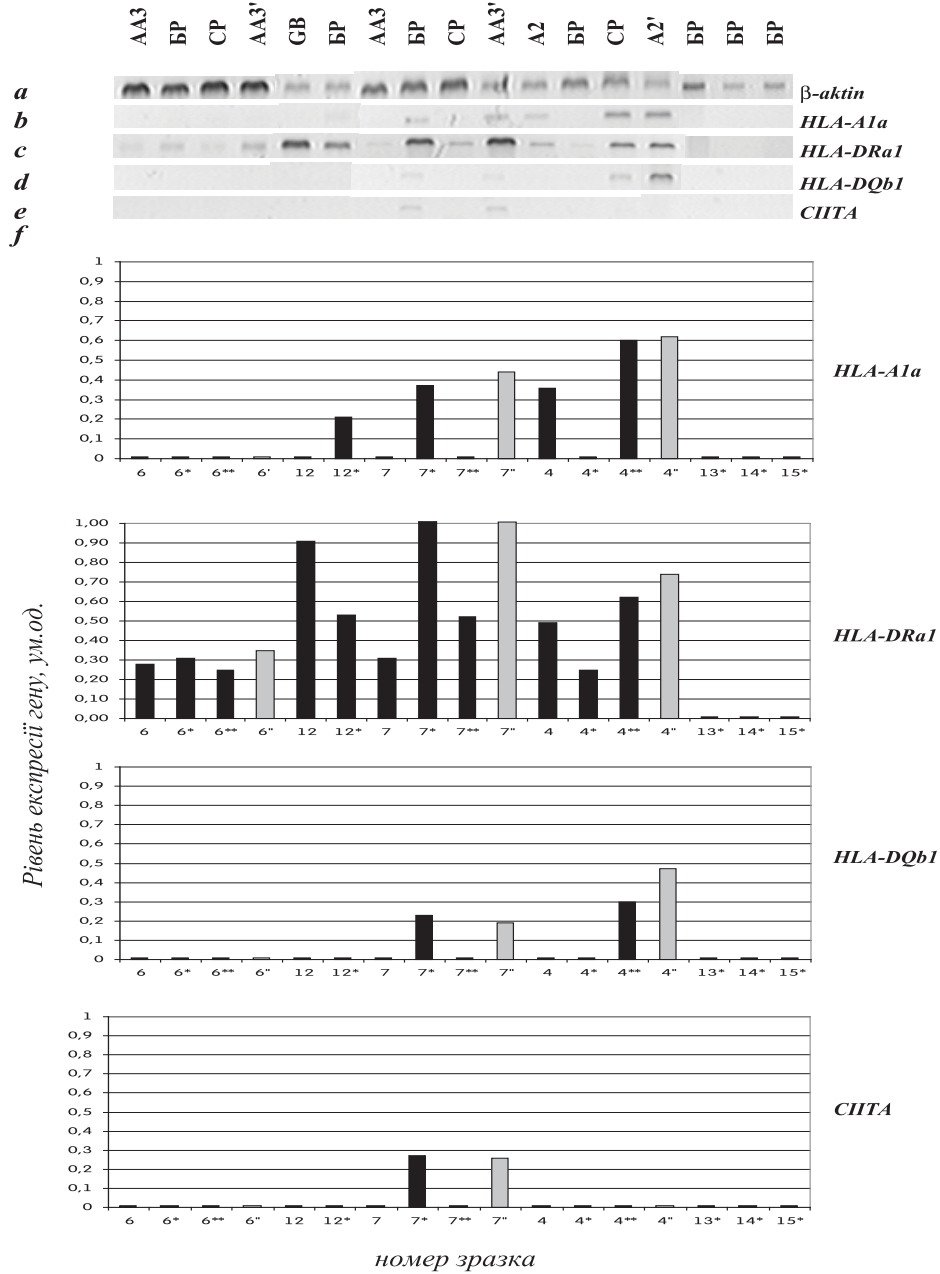


Рис.5. Напівкількісний RT-PCR аналіз експресії генів у клітинах гліом, білої та сірої речовини головного мозку (A2 – астроцитом 2 ступеня злоякісності; AA3 – анапластична астроцитом 3 ступеня злоякісності; GB – гліобластома (4 ступінь злоякісності); БР – біла речовина головного мозку, СР - сіра речовина головного мозку; 1 – номер зразка пухлини, 1''- +СНК (0,10 мг/мл), 1* - біла речовина головного мозку, 1** - сіра речовина головного мозку):

- a – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для β -aktin,
- b – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-A1a,
- c – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-DRa1,
- d – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для HLA-DQb1,
- e – електрофорез PCR-продуктів із праймерами для CIITA,
- f – діаграми відносного рівня експресії генів.

Поряд з цим, у зразках гліом експресію гену HLA-A1a на рівні мРНК зафіксовано у 24,0% досліджених зразків, HLA-Dra1 – у 60,0% зразків, експресію HLA-DQb1 та СІІТА не зареєстровано. При порівнянні із зразками тканини нормального мозку виявилось, що ген HLA-A1a був експресований у 28,6% зразків білої речовини та 33,3% - сірої речовини головного мозку; HLA-Dra1 – у 57,1% зразків білої та всіх досліджених зразках сірої речовини; HLA-DQb1 – у 14,3% зразків білої речовини, у зразках сірої речовини не зареєстрована; СІІТА – у 14,3% зразків білої та сірої речовини головного мозку. Це не протирічить даним [5], згідно яких експресія антигенів HLA II класу реєструвалась в 30% із 44 аналізованих зразків пухлин. На відміну від гліом у дорослих осіб, при пілоцитарній астроцитомі, що характерна для дитячого віку і має прогноз, сприятливий для виживання після хірургічного видалення, експресія генів HLA II класу (HLA-DR α , HLA-DPB1, HLA-DQB1) була підвищена, порівняно з тканиною нормального мозочка, астроцитом 2 ступеню злоякісності та олігодендрогліом [7].

Таким чином, на відміну від протеїнового рівня експресії антигенів HLA на клітинній мембрані, який був зниженим у МНПК хворих з гліомами та у клітинах пухлин (HLA-DR), на рівні мРНК ми не зафіксували зниження експресії досліджуваних генів HLA. Можна висловити припущення, що у хворих з гліомами відбуваються зміни компонентів механізму процесінгу антигенів, зокрема, зміна експресії транспортних молекул (LMP2, TAP1, β 2-мікроглобуліну тощо), які, як відомо, є однією з патогенетичних ланок розвитку онкологічних захворювань [5,6], результатом чого є зниження експресії антигенів HLA на клітинній мембрані МНПК хворих з гліомами та пухлинних клітин.

У нашому дослідженні СНК щура суттєво не впливав на експресію HLA-A,B,C та HLA-DR на протеїновому рівні у МНПК групи порівняння. На рівні мРНК за впливу СНК щура зафіксовано зростання експресії гену HLA-A1a (у 12,5% зразків за впливу 0,10 мг/мл) та HLA-Dra1 (у 25,0% зразків (0,02 мг/мл) та 31,3% проаналізованих зразків МНПК групи порівняння (0,10 мг/мл). У середньому СНК щура несуттєво впливав на експресію антигенів HLA на протеїновому рівні МНПК хворих з гліомами: відсоток HLA-A,B,C+ та HLA-DR+ клітин у суспензіях МНПК залишався зниженим відносно показників МНПК умовно здорових осіб. Однак відсоток HLA-DR+ клітин у суспензіях МНПК хворих з гліомами 2 ступеня злоякісності під впливом СНК зростав, порівняно з МНПК хворих з гліомами 3 ступеня злоякісності та гліобластомами. На рівні мРНК за впливу СНК щура (0,02 та 0,10 мг/мл) суттєвої зміни експресії вказаних генів у МНПК хворих з гліомами не виявлено.

У суспензійних культурах гліом за впливу СНК в обох концентраціях через 24 год кількість HLA-A,B,C+ та HLA-DR+ клітин дещо зростала. Найбільш значуще СНК впливав на суспензійні культури гліобластом: зростав відсоток HLA-A,B,C+ клітин у суспензійних культурах гліобластом у порівнянні з культурами гліом 3 ступеня злоякісності (0,02 мг/мл), а також достовірно зростав відсоток HLA-DR+ клітин (0,02 та 0,10 мг/мл СНК). На рівні мРНК за впливу СНК щура більш значні зміни зафіксовано при концентрації препарату 0,10 мг/мл: експресія HLA-A1a зростала в 36,0% зразків пухлин, HLA-Dra1 – у 72,0% зразків пухлин. Отже, препарат СНК щура здатен впливати на експресію антигенів HLA як на рівні мРНК, так і на протеїновому рівні.

Проведене дослідження показало, що гуморальні фактори НК фетального мозку щура можуть впливати на експресію антигенів гістосумісності і в імунокомпетентних клітинах хворих з гліомами, і безпосередньо у клітинах пухлин, що на нашу думку, може сприяти розпізнаванню клітин гліом та індукції ефективної протипухлинної імунної відповіді, оскільки експресія антигенів II класу МНС є важливою не тільки для реалізації процесу розпізнавання, а і для набуття пухлинними клітинами таких властивостей, як туморогенність і імуногенність.

Передумовою такого впливу, можливо, є здатність ембріональних та фетальних нейроклітин до продукції цитокінів, оскільки відомо, що мультипотентні НПК ссавців (людини, щурів, мишей) експресують як прозапальні, так і супресорні цитокіни (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TGF- β 1, TGF- β 2, TNF- α) [27,28]. Не виключено, що крім названих, у активну діючу фракцію СНК можуть входити також інші молекули з протипухлинною цитотоксичною дією, зокрема, фактор інгібування лейкемії (LIF) [29], а механізм дії НСК-секретованих молекул може залучати регуляторний LIF/JAK/STAT сигнальний шлях [29] та інші, оскільки відомо, що між НСК та нейроімунною сіткою існує двонаправлене перехресне «спілкування» (обмін сигналами та молекулами), яке контролює самовідновлення та диференціацію НСК [30].

Отримані результати дають можливість стверджувати, що препарат СНК можна рекомендувати для подальшого дослідження з метою оцінки перспектив його клінічного застосування при пухлинах головного мозку.

Подяки: автор висловлює щирі подяки науковому керівнику дослідження чл.-кор. НАМН України, д.мед.н., професору Лісяному М.І., а також д.мед.н., професору Розуменку В.Д. та лікарю-нейрохірургу, д.мед.н. Главацькому О.Я. за люб'язно надані зразки пухлин для дослідження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гранов А.М. Канцерогенез и иммунобиология опухоли. Фундаментальные и клинические аспекты / А.М.Гранов, О.Е.Молчанинов // Вопросы онкологии. – 2008. – Т.54, №4.– С.401-409.
2. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины – участники воспаления / Н.М.Бережная // Онкология. – 2009. – Т.11, №1. – С.6-16.
3. Лисяний Н.И. Иммунология и иммунотерапия злокачественных глиом головного мозга / Н.И.Лисяний. – Киев: «Интерсервис». – 2011. – 239с.
4. Learn C.A. Profiling of CD4+, CD8+, and CD4+CD25+CD45RO+FoxP3+ T cells in patients with malignant glioma reveals differential expression of the immunologic transcriptome compared with T cells from healthy volunteers / C.A.Learn, P.E.Fecchi, R.J.Schmittling [et al.] // Clin Cancer Res. – 2006. – Vol.12, №24. – P. 7306-7315.
5. Facoetti A. Human leukocyte antigen and antigen processing machinery component defects in astrocytic tumors / A.Facoetti, R.Nano, P.Zelini [et al.] // Clin Cancer Res. – 2005. – Vol.11, № 23.-P.8304-8311.
6. Mehling M. WHO grade associated downregulation of MHC class I antigen-processing machinery components in human astrocytomas: does it reflect a potential immune escape mechanism? / M.Mehling, P.Simon, M.Mittelbronn [et al.] // Acta Neuropathol.- 2007.-Vol.114, № 2.-P.111-119.
7. Huang H. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas / H.Huang, A.Hara, T.Homma [et al.] // J.Neuropathol Exp. Neurol.- 2005.-Vol.64, №10.-P.891-901.
8. Kren L. Production of immune-modulatory non-classical molecules HLA-G and HLA-E by tumor infiltrating ameboid microglia/macrophages in glioblastomas: a role in innate immunity? / L.Kren, K.Muckova, E.Lzicarova [et al.] // J.Neuroimmunol.– 2010.–Vol.220, № 1-2.– P.131-135.
9. Kren L. Expression of immune-modulatory molecules HLA-G and HLA-E by tumor cells in glioblastomas: an unexpected prognostic significance? / L.Kren, O.Slaby, K.Muckova K. [et al.] // Neuropathology.- 2011.- № 2.-P.129-134.
10. Satoh E. 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.-Vol.104, № 2.-P.264-271.
11. Haque A. Induction of apoptosis and immune response by all-trans retinoic acid plus interferon-gamma in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells. / A.Haque, A.Das, L.M.Hajiaghamohseni [et al.] // Cancer Immunol Immunother.– 2007.– Vol.56, №5.–P.615-25.
12. Семенова В.М. Изучение противоопухолевых свойств различных популяций клеток головного мозга в культуре нервной ткани in vitro / В.М.Семенова, В.И.Цымбалюк, Л.П.Стайно Л.П. [и др.] // Иммунная система головного мозга. – К., 1999.–С.136-146.
13. Aboody K.S. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy / K.S.Aboody, J.Najbauer, M.K.Danks // Gene Ther.– 2008.– Vol.15, №10.–P.739-752.
14. Achanta P. Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment / P.Achanta, N.I.Sedora Roman, A.Quinones-Hinojosa // Anticancer Agents Med.Chem.– 2010.–Vol.10, №2.–P.121-130.
15. Ito S. Human neural stem cells transduced with IFN-beta and cytosine deaminase genes intensify bystander effect in experimental glioma / S.Ito, A.Natsume, S.Shimato [et al.] // Cancer Gene Ther.– 2010.–Vol.17, №5.–P.299-306.
16. Kim S.U. Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors / S.U.Kim // Stem Cell Rev.– 2011.–Vol.7, №1.–P.130-140.
17. Kim J.H. Stereological analysis on migration of human neural stem cells in the brain of rats bearing glioma / J.H.Kim, J.E.Lee, S.U.Kim, K.G.Cho // Neurosurgery.- 2010.-Vol.66, №2.-P.333-342.
18. Семенова В.М. Дослідження протипухлинної дії супернатанту прогеніторних нейроклітин щура на клітини гліом в умовах культивування / В.М.Семенова, Л.Д.Любич, М.І.Лисяний [та ін.] // Укр.нейрохірург.журнал.-2008.-№ 4.-С.63-66.
19. Семенова В.М. Исследование биологических свойств супернатанта прогениторных нейроклеток крыс на культурах глиом головного мозга / В.М.Семенова, Л.Д.Любич, Н.И.Лисяний [и др.] // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 27. -Спб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011.- С.58-68.
20. Лисяний М.І. Дослідження протипухлинної дії прогеніторних нейроклітин (НК) при експериментальній гліомі головного мозку у щурів / М.І.Лисяний, Л.Д.Любич, А.Г.Хохлов // Імунологія та алергологія.-2008.-№ 3.-С.61-66.
21. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / В.П.Божкова, Л.А.Брежестовский, В.М.Буравлев [и др.].- М.:Наука, 1988. - 318 с.
22. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л.А.Остерман.- М., МЦНМО, 2002, 248 с.

23. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека / Пособие для врачей-лаборантов // Сост.: Пинегин Б.В. и др. - М., 2001. - С.48-53.
24. *Ogden A.T.* Defective receptor expression and dendritic cell differentiation of monocytes in glioblastomas / A.T.Ogden, D.Horgan, A.Waziri [et al.] // *Neurosurgery.* - 2006. - Vol.59, №4. - P.902-909.
25. *Лісяний М.І.* Дослідження впливу експресії антигенів HLA нейроклітинами людини різного терміну гестації in vitro / М.І.Лісяний, Л.Д.Любич, В.М.Семенова [та ін.] // *Імунологія та алергологія.* - 2008. - № 1. - С.14-19.
26. *Read S.B.* 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. - Vol.23, №7. - P.379-393.
27. *Klassen H.J.* Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells / H.J.Klassen, K.L.Imfeld, I.I.Kirov [et al.] // *Cytokine.* - 2003. - Vol.22, № 3-4. - P.101-106.
28. *Staflin K.* Instructive cross-talk between neural progenitor cells and gliomas / K.Staflin, M.Lindvall, T.Zuchner, C.Lundberg // *J.Neurosci. Res.* - 2007. - Vol.85, №10. - P.2147-2159.
29. *Chen H.C.* Neural stem cells secrete factors that promote auditory cell proliferation via a leukemia inhibitory factor signaling pathway / H.C.Chen, H.I.Ma, H.K.Sytwu [et al.] // *J.Neurosci. Res.* - 2010. - Vol.88, №15. - P.3308-3318.
30. *Molina-Holgado E.* Mending the broken brain: neuroimmune interactions in neurogenesis / E.Molina-Holgado, F.Molina-Holgado // *J.Neurochem.* - 2010. - Vol.114, №5. - P.1277-1290.

РЕЗЮМЕ

ВЛИЯНИЕ СУПЕРНАТАНТА ПРОГЕНИТОРНЫХ НЕЙРОКЛЕТОК КРЫСЫ НА ЭКСПРЕССИЮ АНТИГЕНОВ HLA МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КЛЕТКАМИ ОПУХОЛЕЙ БОЛЬНЫХ С ГЛИОМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА in vitro

Любич Л.Д.

ДУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины»

Цель работы - исследовать влияние супернатанта прогениторных нейроклеток (СНК) крысы 12-16 суток гестации (E12-16) на экспрессию антигенов гистосовместимости в мононуклеарах периферической крови (МНПК) и в клетках опухолей больных с глиомами головного мозга в краткосрочных культурах (24 часа).

Суспензии МНПК больных с глиомами содержали вдвое меньшее количество клеток, экспрессирующих антигены гистосовместимости (HLA-A, B, C+, HLA-

DR+ клеток) по сравнению с МНПК условно здоровых лиц, на уровне мРНК не зафиксировано снижения экспрессии исследуемых генов HLA. Под влиянием СНК крысы (0,02, 0,10 мг/мл) доля HLA-DR+ клеток в суспензиях МНПК больных с глиомами 2 степени злокачественности возрастала, по сравнению с МНПК больных с глиомами 3 степени злокачественности и глиобластомами, но оставалась сниженной относительно показателей МНПК условно здоровых лиц. На уровне мРНК под влиянием СНК крысы возрастала экспрессия гена HLA-A1a (12,5% образцов, 0,10 мг/мл) и HLA-Dra1 (25,0% образцов (0,02 мг/мл); 31,3% образцов (0,10 мг/мл)) в МНПК группы сравнения.

В суспензиях глиом 2 степени злокачественности количество HLA-DR+ клеток было выше, чем в суспензиях глиом 3 и 4 степени злокачественности. Под влиянием СНК в суспензионных культурах глиобластом возрастала доля HLA-A, B, C+ клеток в сравнении с культурами глиом 3 степени злокачественности (0,02 мг/мл), а также увеличивалась доля HLA-DR+ клеток (0,02, 0,10 мг/мл). На уровне мРНК под влиянием СНК крысы (0,10 мг/мл) возрастала экспрессия HLA-A1a (36,0% образцов) и HLA-Dra1 (72,0% образцов опухолей).

Ключевые слова: прогениторные нейроклетки крысы, супернатант, МНПК, глиомы, антигены HLA.

SUMMARY

Effect of rat progenitor neurocells supernatant on the HLA antigens expression of peripheral blood mononuclear cells and tumor cells of patients with cerebral gliomas in vitro

Lyubich L.D.

SI «Acad.A.P.Romodanov Institute of Neurosurgery NAMS of Ukraine», Kyiv

Aim - to evaluate the effect of rat progenitor neural cells supernatant (RPNS) gestation day 12-16 (E12-16) on histocompatibility antigens expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and tumor cells of patients with brain glioma in short-term cultures (24 h).

Suspensions of PBMC of patients with brain glioma contain half the number of HLA-A, B, C+, HLA-DR+ cells comparing with PBMC of healthy individuals, at the level of mRNA the lower expression of the studied genes HLA is not recorded. RPNS (0,02, 0,10 mg/ml) increased the rate of HLA-DR+ cells in suspensions of PBMC of patients with glioma grade 2 malignancy, comparing with PBMC of patients with glioma grade 3 malignancy and glioblastoma, but this rate was lower comparing with healthy individuals. At the level of mRNA RPNS increased expression of gen HLA-A1a (12,5% samples, 0,10 mg/ml) and HLA-Dra1 (25,0% samples (0,02 mg/ml); 31,3% samples (0,10 mg/ml)) in PBMC of healthy individuals.

In suspensions of glioma grade 2 malignancy the number of HLA-DR+ cells was higher than in suspensions of glioma grade 3 and 4 malignancy. RPNS increased the rate of HLA-A, B, C+ cells in short-term cultures of glioblastoma comparing with cultures of glioma grade 3 malignancy (0,02 mg/ml), and increased the rate of HLA-DR+ cells (0,02, 0,10 mg/ml). At the level of mRNA RPNS (0,10 mg/ml) increased expression of gen HLA-A1a (36,0% samples) and HLA-Dra1 (72,0% tumor samples).

Key words: rat progenitor neurocells, supernatant, PBMC, glioma, HLA antigens.