

ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕНОТИПУ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН У ПУХЛИНАХ ЦНС РІЗНОГО ГІСТОГЕНЕЗУ ТА СТУПЕНЮ ЗЛОЯКІСНОСТІ*ЛІСЯНИЙ М.І., БЕЛЬСЬКА Л.М.*

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

Протягом тривалого періоду проводяться дослідження, пов'язані з вивченням особливостей взаємодії імунних клітин з клітинами пухлин, в тому числі пухлин ЦНС. Активність місцевих протипухлинних реакцій визначає баланс імунокомпетентних клітин і продукованих імунокомпетентними і пухлинними клітинами цитокинів, що активують імунокомпетентні клітини (інтерлейкіни ІЛ1,2,12), або пригнічують їх активність (ІЛ10, TGF). У ряді робіт [1,2] показана інфільтрація пухлин ЦНС макрофагами/ мікроглією, нейтрофілами, Т-лімфоцитами, В-клітинами і НК-клітинами. Наявність високого вмісту CD8+ клітин серед ПІЛ (пухлин інфільтруючих лімфоцитів) пов'язують з більшою протипухлинною активністю, тоді як високі рівні CD4+ Th клітин, зокрема, підтип Th2-клітин і Т-рег (Т регуляторних) клітин – зі сприянням розвитку пухлини [3].

CD4+ Th-клітини (Th1, Th2, Th17 і T regs) відіграють важливу роль і в регуляції фенотипу макрофагів, що інфільтрують пухлину. Th1 лімфоцити викликають класичну M1 поляризацію макрофагів за рахунок продукції IFN- γ , тоді як поляризація M2 макрофагів індукується клітинами Th2 типу за рахунок IL-4 і IL-13. Відомо, що субпопуляція макрофагів M1 бере участь в якості індуктора ефекторних клітин і поляризації Th1-відповіді за допомогою продукування прозапальних цитокинів, включаючи інтерлейкін 1 (IL-1), TNF α і інтерлейкін 6 (IL-6) [4]. Макрофаги M1 продукують IL12, IL23 та здатні сприяти загибелі пухлинних клітин.

M2 макрофаги беруть участь в активації Th2 імунної відповіді і їх присутність в пухлинах асоціюється з прогресуванням розвитку пухлини [5]. Додатково вони супресують цитотоксичну активність Т-лімфоцитів за рахунок блокади проліферації і інфільтрації пухлин CD8+ Т клітинами [6,7]. M2 макрофаги пригнічують фагоцитоз, індуюють секрецію імуносупресорних цитокинів, таких як IL10, TGF мікрогліальними клітинами. Дана субпопуляція макрофагів впливає на розвиток ангиогенезу через вивільнення проангіогенних чинників зростання, таких як судинно-ендотеліальний фактор росту А (VEGF-A) [4].

Відомо, що натуральні природні кілерні клітини (НК) відіграють провідну роль в проти-

пухлинному імунитеті. НК клітини цитотоксично впливають на пухлинні клітини декількома шляхами, основним з яких є перфорино-гранзимовий шлях, що приводить до загибелі клітин, з іншого боку вони конститутивно експресують CD95-ліганд і TNF α на поверхні клітини, які зв'язуються з апоптозними рецепторами на клітинах-мішенях, що також призводить до апоптозу мішеней. Захисну роль НК клітини виконують за допомогою активаційного рецептора NKG2D і активаційних рецепторів сімейства NCR. Роль рецептора NKG2D у відторгненні пухлини демонструється більш швидким ростом пухлини у мишей, які отримували анти-NKG2D-антитіла [8]. Крім того, НК-клітини секретують різні цитокини і хемокини (наприклад, IFN γ), які мають імуномодулюючі ефекти, такі як праймування Th1 Т-клітинних реакцій і класична поляризація M1 макрофагів. Інфільтрацію пухлини НК клітинами пов'язують з більш сприятливим перебігом пухлинного процесу [9].

У пухлинах головного мозку протипухлинний вплив НК-клітин продемонстровано як *in vitro* [10], так і *in vivo* [11]. Більш того, ці клітини ідентифіковані як в первинних (наприклад, менінгіоми і гліоми), так і метастатичних новоутвореннях головного мозку [12,13]. Однак рівень інфільтрації пухлини НК клітинами має тенденцію залишатися низьким, а функціональність даних клітин часто залежить від чинників, що вивільняються пухлиною і/або іншими імуносупресивними клітинами [14].

У деяких роботах продемонстрована інфільтрація пухлин мозку, а саме: менінгіом [12,15] та гліом В-клітинами. Однак дані В-клітини представляли лише незначну частку інфільтратів імунних клітин і їх роль у розвитку пухлин не до кінця з'ясована. З одного боку описано, що В-клітини можуть діяти як антиген-презентуючі клітини (APC) і, отже, вони можуть індукувати CD4+ Т-клітино-залежні CD8+ Т-клітини пам'яті, які допомагають контролювати пухлинну інвазію, поширення і метастази. З іншого боку продемонстровано, що В-клітини пригнічують розвиток імунних реакцій в деяких пухлинах і безпосередньо регулюють ефекторні функції макрофагів за допомогою вироблення IL-10, який може активувати макрофаги M2 фенотипу і сприяти розвитку пухлин [16].

Таким чином, на сучасному етапі досліджень показана важлива роль імунних клітин, що інфільтрують пухлини, в розвитку та контролі пухлинного росту, при цьому залишається безліч питань стосовно їх кількості та ролі в туморогенезі, що вказує на необхідність їх подальшого дослідження.

Мета – дослідити вміст імунокомпетентних клітин в пухлинному вогнищі у хворих з гліомами різного ступеню анаплазії.

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріалом дослідження слугували біоптати (55 зразків) внутрішньомозкових пухлин різного генезу, отримані у хворих під час нейрохірургічних операцій. Гістологічна діагностика пухлин на біоптичному матеріалі здійснювалась у відділі нейропатоморфології ДУ «Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» згідно останній Міжнародній класифікації ВОЗ пухлин ЦНС (2007). На гістологічних препаратах оцінювали особливості їх клітинного складу та загальної гістоструктури, мітотичну активність, наявність регресивних змін. Для гістологічних досліджень використовували біокулярний мікроскоп з візуалізацією зображення (NIKON, Японія).

Отримання суспензії клітин пухлинного вогнища. Пухлинну тканину із біопсійного матеріалу забирали під час оперативного втручання в середовище Ігла. Фрагменти пухлини дисоціювали та готували суспензії клітин стандартної концентрації (1×10^6 /мл) в поживному середовищі ДМЕМ. Життєздатність клітин оцінювали стандартним тестом за допомогою вітального фарбування розчином 0,2% трипанового синього [17].

Дослідження фенотипу лейкоцитів, що інфільтрують пухлини ЦНС. Вивчення фенотипу клітин проводили за допомогою моноклональних антитіл до молекул CD45 (загальний лейкоцитарний антиген), CD3 (Т-лімфоцити), CD4 (Т-хелпери), CD8 (цитотоксичні Т-лімфоцити), CD16 (природні кіллери), CD14 (клітини моноцитарно/макрофагального ряду), CD20 (В-клітини) по протоколу цитофлюориметрії FACS Calibur на проточному цитофлюориметрі «FC-500» («Beckman Coulter», США) за програмою Cytomics CXP Softwar згідно методичним рекомендаціям [18,19].

Статистичну обробку матеріалів проводили по комп'ютерній програмі Statistika 8 з визначенням середнього арифметичного та квадратичного відхилення (σ) та показника «Р» за програмою статобробки для Microsoft Excel 2007r. з визначенням середнього арифметичного і стандартного статистичного відхилення ($m \pm \sigma$) і показника t-Стюдента. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження фенотипового складу лімфоцитів, що інфільтрують пухлини, показало присутність в гліальних і менінгіальних пухлинах CD 45+ клітин ($15,27 \pm 9,61$)% та ($9,82 \pm 4,57$)% відповідно. При цьому 56,2% дослідних зразків біоптатів гліом були значно інфільтровані CD 45+ клітинами (кількість CD 45+ клітин перевищувала 10%), 18,7% мали середню ступінь інфільтрації (кількість CD 45+ клітин була від 5 до 10%) та в 25,1% випадків мали низьку ступінь інфільтрації CD45+ клітинами (CD45+ клітин менше 5%).

Подальше дослідження фенотипового складу лімфоцитів, що інфільтрують пухлини ЦНС, показало наявність різних субпопуляцій лімфоцитів, а саме: Т-хелперів, цитотоксичних лімфоцитів, НК-клітин, В клітин та клітин моноцитарно/макрофагального ряду. Як видно з даних, наведених в таблиці 1, відносна кількість CD3+ Т-лімфоцитів, що інфільтрують гліальні пухлини, в середньому складала $11,59 \pm 10,54$ %, що було в 2-2,5 рази більше в порівнянні до відповідних показників пухлин іншого гістогенезу – менінгіом.

Вміст CD4+ та CD8+ Т-лімфоцитів також в біоптатах гліальних пухлин в середньому вдвічі перевищував відповідні показники менінгіом. Визначення співвідношення між основними імунорегуляторними CD4+ та CD8+ Т-лімфоцитами при гліомах показало, що при гліомах в 31,2% випадках відносна кількість CD4+ та CD8+ була приблизно однакова, в 59,3% випадків вміст CD4+ перевищував вміст CD8+ і тільки в 9,5% досліджень кількість CD8+ клітин була більшою за відповідні показники CD4+ клітин. Кількість ефекторних НК-клітин у гліомах різного ступеню злоякісності становила $5,95 \pm 3,27$ % при $2,92 \pm 1,93$ % у менінгіомах. Найменше як гліальні, так і менінгіальні пухлини ЦНС були інфільтровані В-клітинами (див. дані табл.1).

Таблиця 1

Фенотипова характеристика лімфоцитів інфільтрату пухлин ЦНС різного гістогенезу

Показники	Менінгіоми (n=12)	Гліоми (n=43)
CD3 + (%)	$3,19 \pm 1,17$	$13,59 \pm 8,54^*$
CD4 + (%)	$2,93 \pm 2,19$	$6,28 \pm 4,66$
CD8 + (%)	$2,97 \pm 2,12$	$4,67 \pm 2,86$
CD16 + (%)	$2,92 \pm 1,93$	$5,95 \pm 3,27$
CD20 + (%)	$0,74 \pm 0,31$	$1,75 \pm 0,54$
CD14 + (%)	$12,2 \pm 11,03$	$11,94 \pm 6,81$

Примітка: * - різниця показників ($p < 0,05$) між дослідними групами

Дослідження вмісту іншої популяції – клітини моноцитарно-макрофагального ряду (CD14+) в біоптатах гліальних та менингіальних пухлин ЦНС показало, що їх кількість в менингіальних пухлинах була $12,2 \pm 11,03\%$, а в гліальних пухлинах в середньому становила $11,94 \pm 6,81\%$ при індивідуальних коливаннях від $3,9\%$ до $19,9\%$.

Таким чином, дослідження біоптатів пухлин ЦНС різного генезу незалежно від ступеня злоякості показало, що дані пухлини неоднаково інфільтровані клітинами лімфоїдного та моноцитарно-макрофагального ряду, які можуть визначати інтенсивність місцевих імунних ре-

акцій. В гліомних пухлинах серед клітин лімфоїдного ряду переважають CD4+ клітини, вміст яких становив від 5 до 10% в 44,4% випадків, а в 33,4% випадків ступінь інфільтрації даною субпопуляцією клітин перевищувала 10%. Кількісний вміст ефекторних імунних клітин в пухлинах гліом, а саме: цитотоксичних лімфоцитів та НК клітин був значно меншим і ні в одному випадку не перевищував 10% (табл.2). Менингіальні пухлини були менш інфільтровані клітинами лімфоїдного ряду. Так, вміст CD4+ Т-лімфоцитів в цих пухлинах тільки в 24,8% був до 10%, а вміст CD8+ та CD16+ клітин не перевищував 5% ні в одному з дослідних зразків.

Таблиця 2

Вміст ефекторних клітин в пухлинах ЦНС різного гістогенезу

Показники	Менингіоми			Гліоми		
	< 5%	5-10%	>10%	< 5%	5-10%	>10%
CD4+	75,2	24,8	0	22,2	44,4	33,4
CD8+	100	0	0	55,5	44,4	0
CD16+	100	0	0	37,7	62,5	0

Дослідження фенотипу інфільтрату гліальних пухлин в залежності від ступеня злоякості показало, що у зразках гліом 1-2 ступеня злоякості відносний вміст CD45+ клітин в середньому був в 1,5-2,0 рази меншим в порівнянні до відповідних показників в гліомах 3-4 ступеня злоякості. При цьому визначалось значне варіювання індивідуальних показників. Відносний вміст CD45+ клітин варіював від 3,6% до 12,7% – гліоми 1-2 ступеня анаплазії та від 3,3% до 24,1% – гліоми 3-4 ступеня анаплазії, при цьому в 90 % гліобластом, анапластичних астроцитом та анапластичних олігодендрогліом вміст CD45+ клітин перевищував 5%, тобто дані пухлини переважно високо інфільтровані CD45+ імунокомпетентними клітинами.

Отримані нами результати певною мірою співпадають з даними Andaloussi A.E. and Lesniak S.M. (2006) [20], які визначали рівень лімфоцитів, що інфільтрують пухлини, в біоптатах гліобластом методом проточної цитофлуориметрії. Кількість CD3+ Т-лімфоцитів у хворих зі злоякісним перебігом гліом в середньому була в 1,3 рази більшою в порівнянні до показників хворих з доброякісним перебігом. При цьому слід зауважити, що як у хворих з доброякісним перебігом, так і у хворих зі злоякісним перебігом гліом, ми визначали значний розмах індивідуальних коливань даної популяції від 2,1% до 18,3% (гліоми 3-4 ст. злоякості) та від 3,5% до 10,3% (гліоми 1-2 ст. злоякості). Ступінь інфільтрації доброякісних гліом основними імунорегуляторними субпопуляціями лімфоцитів, а саме: CD4+ та CD8+ Т-клітинами статистично вірогідно не відрізнялась між собою, їх відносний вміст був приблизно однаковий (див.табл. 3).

Таблиця 3

Фенотипова характеристика лімфоцитів інфільтрату гліальних пухлин ЦНС

Показники	Гліома 1-2 ст. злоякості (n=14)	Гліома 3-4 ст. злоякості (n=29)
CD3+ (%)	9,26±2,57	11,97±4,43
CD4+ (%)	5,77±3,23	7,95±4,87
CD8+ (%)	5,35±3,52	4,23±3,04
CD4+/CD8+	1,07	1,87*
CD16+ (%)	7,56±5,22	4,85±3,12
CD20+ (%)	1,69±0,48	1,93±0,64
CD14+ (%)	9,76±5,54	14,66±4,47

Примітка: * – різниця показників (p < 0,05) між дослідними групами.

В злоякісних гліомах, в порівнянні з доброякісними гліомами, ми визначали в середньому підвищення відносної кількості CD4+ лімфоцитів в 1,4 рази та зменшення на 40-45% CD8+ лімфоцитів. Звертає на себе увагу, що в межах гліом 3-4 ступеня злоякості ми виявили дисбаланс між CD4+ та CD8+ Т-лімфоцитами, який не визначався при доброякісному перебігу гліом. Ступінь інфільтрації злоякісних гліом CD8+ Т-лімфоцитами була в середньому в 1,7-1,8 раз меншою в порівнянні до CD4+ Т-клітин. Отримані нами результати про дисбаланс в біоптатах злоякісних гліом даних субпопуляцій Т-лімфоцитів співпадають з даними [21], проте не співпадають з даними [22,23], в яких виявляли однаковий рівень інфільтрації злоякісних глі-

ом CD4+ та CD8+ Т-лімфоцитами або переважання вмісту CD8+ в порівнянні до вмісту CD4+ Т-клітини. Можливо, різниця отриманих даних обумовлена різними методологічними підходами для визначення рівня, ступеня проникнення та поширеності імунокомпетентних клітин в пухлинах ЦНС, а саме: імуногістохімічного або цитофлуориметричного методу. Також не можна виключити нерівномірну локалізацію лімфоцитів в різних відділах пухлини.

Виявлене в наших дослідженнях підвищення кількості в злоякісних гліомах клітин, що експресують на своїй поверхні CD4+, можливо відбувається за рахунок інфільтрації даних пухлин Т-хелперними клітинами, при цьому можливо переважно Th2 типу, оскільки описана переважно продукція IL4 та IL10 лімфоцитами, що інфільтрують гліобластоми [24]. На нашу думку, не можна виключити присутність серед CD 4+ клітин і Т-регуляторних лімфоцитів, які мають фенотип CD4+CD25+ і за рахунок CCL2 і CCL22 хемоатрактантів гліомних клітин накопичуються в пухлинному вогнищі [25]. Зменшення кількості ефекторних цитотоксичних лімфоцитів при злоякісному перебігу гліом може бути обумовлене декількома механізмами: продукцією TGF- β , що секретується локально пухлинними, інфільтративними клітинами та пригнічує проліферацію Т-клітин, їх активацію та диференціацію в ефекторні клітини. Експресією на поверхні злоякісних гліом CD 70 FasL, які при взаємодії з відповідними CD 27 та FasR на поверхні цитотоксичних CD8+ лімфоцитів викликають апоптоз та анегію останніх [25]. Експресією клітинами гліобластом індоламін 2,3-діоксигенази (IDO), що інгібує проліферацію CD8+ Т-клітин. Також взаємодія між PDL1, що експресується на гліобластомах та клітинних лініях гліом і PD1, на Т-клітинах інгібує проліферацію та цитотоксичність Т-лімфоцитів [26].

Дослідження іншої популяції ефекторних клітин показало, що у хворих з гліомами 3-4 ступеня анаплазії, в середньому ми визначали півторазове зменшення кількості CD16+ клітин в порівнянні до відповідних показників в гліомах 1-2 ступеня злоякісності. При цьому, як при доброякісному, так і злоякісному перебігу гліом, були значні індивідуальні коливання від 1,1% до 8,9%, в злоякісних гліомах, так і від 3,3% до 9,2% в доброякісних гліомах. Відносна кількість В-клітин в біоптатах як злоякісних, так і доброякісних гліом була невеликою, - до 2%, та статистично вірогідно не вирізнялась.

При вивченні вмісту клітин моноцитарно/макрофагального ряду в біоптатах злоякісних гліом в порівнянні до доброякісних встановлено, що кількість субпопуляції CD14+ клітин в злоякісних гліомах в середньому в 1,5 рази була вищою. Накопичення CD14+ клітин в пухлин-

ному вогнищі може бути наслідком активного проникнення моноцитів з периферичної крові у відповідь на продукцію клітинами гліобластом хемоатрактантів. Не можна також виключити накопичення в пухлинному вогнищі мікрогліальних клітин, які мігрують туди з інших відділів головного мозку.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що гліальні пухлини головного мозку мають певну інфільтрацію імунокомпетентними клітинами, а саме: лейкоцитами, клітинами моноцитарно-макрофагального ряду, Т-лімфоцитами, цитотоксичними лімфоцитами, НК та В-клітинами, які визначають ступінь та активність місцевих протипухлинних реакцій. Розвиток злоякісних гліом супроводжується зменшенням в пухлинному середовищі клітин, які відіграють провідну роль в лізисі та елімінації пухлинних клітин за рахунок ефекторних механізмів імуногенезу та підвищенням клітин макрофагального ряду, які можуть поляризуватися по M2 типу і сприяти розвитку пухлини.

ВИСНОВКИ

1. Пухлини головного мозку інфільтровані різними субпопуляціями імунних клітин, а саме: Т-, В-лімфоцитами, НК клітинами та клітинами моноцитарно/макрофагального ряду. Ступінь інфільтрації даними клітинами залежить від гістогенезу пухлин ЦНС.
2. В пухлинах гліом в порівнянні до менінгіом виявлено в середньому в 1,6 разів підвищення CD 45+ клітин та двократне підвищення Т-лімфоцитів та В-клітин.
3. В біоптатах доброякісних астроцитом в середньому в 1,3 рази був зменшений вміст CD 3+ та CD4+ клітин та в 1,5 рази підвищений вміст НК клітин в порівнянні до гліобластом та анапластичних астроцитом.
4. Злоякісні гліоми характеризуються зменшенням в пухлинному вогнищі кількості імунних клітин, що відіграють провідну роль в лізисі та елімінації пухлинних клітин та підвищенням рівня клітин моноцитарно/макрофагального ряду, які можуть сприяти розвитку пухлин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Parney I.F.* Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. Laboratory investigation / I.F. Parney, J.S. Waldron, A.T. Parsa // J. Neurosurg., 2009. – N.110, – P. 572-582.
2. *Domingues P.H.* Immunophenotypic identification and characterization of tumor cells and infiltrating cell populations in meningiomas. Am J Pathol. / P.H. Domingues, C. Teodosio, J. Ortiz et al. // J. Pathol., 2012. - N.181. -P.1749–1761.

3. *Hamilton A.* Role of the systemic immune system in brain metastasis. / A.Hamilton, N.R. Sibson // *Mol. Cell Neurosci.*, 2013. – N.53. – P.42-51.
4. *Hao N.B.* Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors / [N.B. Hao, M.H., Y.H. Lu Fan et al.] // *Clin. Dev. Immunol.*, 2012.- N.12,-P.948-951.
5. *Muraille E.* TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? / [E. Muraille, O. Leo, M. Moser.] // *Front.Immunol.*, 2014. – N5. – P. 603.
6. *Shiao S.L.* Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy / [S.L. Shiao, A.P.Ganesan, H.S. Rugo, L.M. Coussens] // *Genes Dev.*, 2011. – N. 25 – P 2559–2572.
7. *Gabrusiewicz K.* Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas. Ellert-Miklaszewska / K.A. Gabrusiewicz, M.Lipko, et al.// *PLoS One.*, 2011. – N 6. – P. 23902.
8. *Пинегин Б.В.* НК-клетки свойства и функции / Б.В.Пинегин., С.В. Дымбаева // *Иммунология.*, 2007. – Т.28, №2. – С.105-113.
9. *Domingues P.H.* The protein expression profile of meningioma cells is associated with distinct cytogenetic tumour subgroups / [P.H. Domingues, C.Teodosio, A.Otero et al.] // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2014. – N.11. – P. 294-305.
10. *Castriconi R.* NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties / [R.Castriconi, A.Daga, A.Dondero et al.] // *J. Immunol.* – 2009, N16. – P. 3399-3408.
11. *Alizadeh D.* Induction of anti-glioma natural killer cell response following multiple low-dose intracerebral CpG therapy / [D.Alizadeh, L.Zhang, C.E.Brown et al.] // *Induction of anti-glioma natural Clin.Cancer Res.* – 2010, N.16. – P. 3399–3408.
12. *Dunn I.F.* Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma / I.F. Dunn, W.T. Curry // *Cancer Immunity.* – 2007, V. 7, №12. – P. 1-24.
13. *Hamilton A.* Role of the systemic immune system in brain metastasis / A.Hamilton, N.R. Sibson // *Mol. Cell Neurosci.* – 2013, N.53. – P. 42–51.
14. *Kmieciak J.* Natural killer cells in intracranial neoplasms: presence and therapeutic efficacy against brain tumours / J. Kmiecik, J. Zimmer, M. Chekenya // *J. Neuro Oncol* – 2014, N. 116 – P. 1-9.
15. *Crane C.A.* TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. / C.A.Crane, S.J.Han, J.J.Barry et al.// *Neuro Oncol.* – 2010. – N12. – P. 7-13.
16. *Biswas S.K.* Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. / S.K.Biswas, A.Mantovani // *Nat. Immunol.* – 2010, N. 11. – P 889-896.
17. *Божкова В.П.* Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / В.П. Божкова, Л.А. Брежетоаский, В.М. Буравлев М. Наука, 1988 – 318 с.
18. *Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека /Пособие для врачей-лаборантов. Составители: Пинегин Б.В. и др. – М., 2001. – 53 с.*
19. *Parks D.R.* Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting (FACS)/ D.R. Parks et al. // *In handbook of experimental immunology.* – 1986 – P. 467.
20. *Andaloussi E.A. and Lesniak M.S.* An increase in CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme / *Neuro-Oncology.* – 2006, N6. – P. 234-243.
21. *Wazini A.* Glioblastoma-derived mechanisms of systemic immunosuppression // *Neurosurg Clin N Amm.* – 2010, N.21. – P. 21-42.
22. *Han S.* Tumour-infiltrating CD4+ and CD8+ lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. /S.Han., C. Zhang , Q Li // *Tumour British Journal of cancer.* – 2014, № 110 – P. 367-374.
23. *Rossi M.L.* The mononuclear cell infiltrate compared with survival in high-grade astrocytomas / [M.L. Rossi , N. R. Jones, E. Candy et al.] // *Acta Neuropathol*, 1989. – N. 78. – P. 189-193.
24. *Zisakis A.* Comparative analysis of peripheral and localised cytokine secretion in glioblastoma patients / [A. Zisakis, C. Piperi, M.S. Themistocleous, et al.] // *Cytokine.* – 2007, №.39 – P. 99-105.
25. *Jacobs JF.* Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors / [J.F. Jacobs, A.J. Idema, K.F. Bol et al.] // *J. Neuroimmunol.*, 2010 – № 225. – P. 195-199.
26. *Wischhusen J.* Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma / [J. Wischhusen, G. Jung, I. Radovanovic et al.] // *Cancer Res.* – 2002. – №.62. – P. 2592-2599.
27. *Avril T.* Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed

cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions / [T.Avril, S.Saikali, E.Vauleon E et al.] // J. Neuroimmunol. – 2010. – №. 25. – P. 22-23.

РЕЗЮМЕ

ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕНОТИПУ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН В ПУХЛИНАХ ЦНС РІЗНОГО ГІСТОГЕНЕЗУ ТА СТУПЕНЮ ЗЛОЯКІСНОСТІ

Лісяний М.І., Бельська Л.М.

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

На сучасному етапі досліджень продемонстрована важлива роль імунних клітин, що інфільтрують пухлини, в розвитку та контролі пухлинного росту. У ряді робіт показана інфільтрація пухлин ЦНС макрофагами/мікроглією, нейтрофілами, Т-регуляторними клітинами тощо. При цьому залишається безліч питань стосовно їх кількості та ролі в туморогенезі, що вказує на необхідність їх подальшого дослідження.

Мета – дослідити вміст імуннокомпетентних клітин в пухлинному вогнищі у хворих з пухлинами різного гістогенезу та ступеню злоякісності.

Матеріалом дослідження слугували біоптати (55 зразків) внутрішньомозкових пухлин різного генезу, отримані у хворих під час нейрохірургічних операцій.

Вивчення фенотипу клітин проводили за допомогою моноклональних антитіл до молекул CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD14 та CD20 по протоколу цитофлюориметрії FACS Calibur на проточному цитофлюориметрі «FC-500» («Beckman Coulter», США) за програмою Cytomics CXP Softwar згідно з методичними рекомендаціями.

Результати. Встановлено, що в пухлинах гліом в порівнянні до менингіом виявлене в середньому в 1,6 разів підвищення CD45+ клітин та двократне підвищення Т-лімфоцитів та В-клітин. В біоптатах доброякісних астроцитом в середньому в 1,3 рази був зменшений вміст CD3+ та CD4+ клітин та в 1,5 рази підвищений вміст НК клітин в порівнянні до гліобластом та анапластичних астроцитомом. Найменше гліальні пухлин головного мозку були інфільтровані В-клітинами. Найбільше пухлини менингіом і гліом були інфільтровані клітинами моноцитарно-макрофагального ряду; в біоптатах гліом вміст CD14+ клітин в 90% випадків перевищувала 5%.

Висновки. Злоякісні гліоми характеризуються зменшенням в пухлинному вогнищі кількості імунних клітин, які відіграють провідну роль в лізисі та елімінації пухлинних клітин та підвищенням рівня клітин моноцитарно/макрофагального ряду, які можуть сприяти розвитку пухлин.

Ключові слова: пухлини ЦНС, імуннокомпетентні клітини, фенотип клітин.

РЕЗЮМЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПА ИМУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТК В ОПУХОЛЯХ ЦНС РАЗЛИЧНОГО ГИСТОГЕНЕЗА И СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Лисяный Н.И., Бельская Л.Н.

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

На современном этапе исследований продемонстрирована важная роль иммунных клеток опухолевого инфильтрата в развитии и контроле опухолевого роста. В ряде работ показана инфильтрация опухолей ЦНС макрофагами/микроглией, нейтрофилами, Т-регуляторными клетками и т.д. При этом остается множество вопросов относительно их количества и роли в туморогенезе, что указывает на необходимость их дальнейшего исследования.

Цель – исследовать содержание иммунокомпетентных клеток в опухолевом очаге у больных с опухолями различного гистогенеза и степени злокачественности.

Материалом исследования служили биоптаты (55 образцов) внутримозговых опухолей различного генеза, полученные у больных во время нейрохирургических операций.

Изучение фенотипа клеток проводили с помощью моноклональных антител к молекулам CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD14 и CD20 по протоколу цитофлюориметрии FACS Calibur на проточном цитофлюориметре «FC-500» («Beckman Coulter», США) по программе Cytomics CXP Softwar согласно с методическими рекомендациями.

Результаты. Установлено, что в опухолях глиом по сравнению с менингиомами в среднем в 1,6 раз увеличено содержание CD45+ клеток и двукратно повышено содержание Т-лимфоцитов и В-клеток. В биоптатах доброкачественных астроцитом в среднем в 1,3 раза было уменьшено содержание CD3+ и CD4+ клеток, и в 1,5 раза повышено содержание НК клеток по сравнению с глиобластомами и анапластическими астроцитомами. Наименее глиальные опухоли головного мозга были инфильтрованы В-клетками. Наиболее опухоли менингиом и глиом были инфильтрованы клетками моноцитарно-макрофагального ряда; в биоптатах глиом содержание CD14+ клеток в 90% случаев превышала 5%.

Выводы. В результате проведенных исследований установлено, что глиальные опухоли головного мозга, в сравнении с менингиомами, больше инфильтрованы иммунокомпетентными клетками которые определяют степень и активность местных противоопухолевых реакций. Злокачественные глиомы характеризуются уменьшением в опухолевом очаге количества иммунных клеток, которые играют ведущую роль в лизисе и элиминации опухолевых клеток и повышением уровня клеток моноцитарно/макрофагального ряда, которые могут способствовать развитию опухолей.

Ключевые слова: опухоли ЦНС, иммунокомпетентные клетки, фенотип клеток.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE PHENOTYPE OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN TUMORS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF DIFFERENT HISTOGENESIS AND DEGREE OF MALIGNANCY

Lisiany N.I., Belska L.M.

The State Institution "Institute of neurosurgery n. acad. A. Romodanov AMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

At the present stage of research, the important role of immune cells that infiltrate tumors in the development and control of tumor growth is demonstrated. Several studies show infiltration of central nervous system tumors by macrophages/microglia, neutrophils, T-regulatory cells, and the like. At the same time, there remain a lot of questions regarding their number and role in tumorigenesis, which indicates the need for their further research.

Objective – to investigate the content of immunocompetent cells in the tumor in patients with tumors of different histogenesis and degree of malignancy.

Materials and methods. The research material was biopsy (55 samples) of intracerebral tumors of various genes obtained from patients during neurosurgical operations.

Cell phenotype was studied using monoclonal antibodies to CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD14, and CD20 according to the FACS Salibur cytofluorometry

protocol on the cytofluorometer "FC-500" (Beckman Coulter, USA) under the Cytomics CXP Software program with methodological recommendations.

Results. It has been established that in tumors of glioma compared to meningeoma, an average of 1.6 fold increased CD45+ cells and a doubling of T-lymphocytes and B-cells. In biopsies benign astrocytes in the middle 1.3 times reduced the content of CD 3+ and CD 4+ cells and 1.5 times the increased content of NK cells compared with glioblast and anaplastic astrocytomas. The least glial tumors of the brain were infiltrated into B-cells. The largest tumors of the meningeoma and glioma were infiltrated by cells of the monocyte/macrophage series; in glycoproteins, the content of CD14+ cells in 90% of cases exceeded 5%.

Conclusions. As a result of the research, it was found that glial tumors of the brain, in comparison with meningioma, are more infiltrated by immunocompetent cells that determine the degree and activity of local antitumor reactions. Malignant gliomas are characterized by a decrease in the tumor center of the number of immune cells that play a leading role in the lysis and elimination of tumor cells and increase in the level of cells of the monocytic/macrophage series, which can promote the development of tumors.

Key words: CNS tumors, immunocompetent cells, phenotype of cells.