

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ФАКТОРОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЛИОМАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ АНАПЛАЗИИ НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ*ЛИСЯНИЙ Н.И., ГНЕДКОВА И.А., ПОТАПОВА А.И., БЕЛЬСКАЯ Л.Н.*

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

ВСТУПЛЕНИЕ

Многими авторами показано, что при злокачественных глиомах головного мозга отмечаются сложные иммунные нарушения, характеризующиеся угнетением функции киллерных лимфоцитов, поляризацией макрофагов и нейтрофилов, активацией Т регуляторных супрессорных клеток и т.д. [1-5]. Причиной угнетения иммунных реакций при злокачественных опухолях является выделение клетками опухолей супрессивных факторов, в том числе интерлейкина 10, β -трансформирующего фактора роста, простогландинов и др. [4-6] Природа и механизм действия опухолевых иммуносупрессивных факторов изучены еще недостаточно, неизвестно также, выделяются ли они в циркуляцию или действуют преимущественно внутри опухоли. В периферической крови у больных с глиомами мозга определяют высокие уровни как иммуносупрессивных (ИЛ-4, ИЛ-10), так и провоспалительных (ИЛ-1,6,8) интерлейкинов [4,7,8,9].

Целью настоящей работы было изучение влияния на пролиферацию и субпопуляционный состав лимфоцитов крови в тесте РБТЛ сывороток крови больных с глиальными опухолями различной степени злокачественности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы сыворотки периферической крови 26 больных с глиальными опухолями мозга различной степени злокачественности: глиобластомами (IV степень анаплазии) – 8, атипические астроцитомы (III степень анаплазии) – 7, фибриллярно-протоплазматические астроцитомы (I-II степень анаплазии) – 5, олигоастроцитомы (I-II степень анаплазии) – 6 образцов. Сыворотку получали из крови, взятой для гематологического планового обследования больных перед операцией и хранили при $t -20^{\circ}\text{C}$. После установления гистологического типа опухоли, согласно принятой классификации [10], сыворотки крови больных объединяли и разделяли в зависимости от степени злокачественности опухолей на 4 группы: сыворотки глиобластом (ГБ) и атипических астроцитом (ААСТ), астроцитом (АС) и олигоастроцитом

(ОАС), которые использовали в дальнейших исследованиях в тесте пролиферации лимфоцитов крови в реакции бласттрансформации лимфоцитов в присутствии ФГА (РБТЛ). РБТЛ ставили с цельной кровью условно здоровых людей в микромодификации [11] с незначительными дополнениями [12] в объеме 1,0 мл среды с 10% эмбриональной телячьей сыворотки с антибиотиком гентамицином. В качестве стимулятора пролиферации использовали 100,0 мкл 0,1% р-ра ФГА (фирмы Sigma). В опытные пробы добавляли по 100,0 мкл сыворотки крови больных с глиомами мозга определенной гистоструктуры, в контрольный образец РБТЛ – 100,0 мкл сыворотки крови доноров.

Учет РБТЛ производили через 72 часа морфологическим методом, подсчет количества ядерных клеток в пробах после РБТЛ определяли в камере Горяева с 3% уксусной кислотой общепринятым методом. Субпопуляционный состав лимфоцитов после РБТЛ исследовали с помощью панели (CD-3,4,8,16,20) моноклональных антител (Becton Dickinson), согласно рекомендаций к антителам на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter P-500 [13].

Статистическую обработку данных проводили по программе статистики для Microsoft Excel 2007г. с определением средней арифметической и стандартного статистического отклонения ($m \pm$) и показателя t-Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании содержания ядросодержащих клеток после постановки РБТЛ с ФГА установлено, что изучаемые сыворотки крови обладали способностью тормозить пролиферацию клеток (табл.1). Так, в контроле РБТЛ с ФГА+, в сыворотке доноров количество ядросодержащих клеток было $1,57 \pm 0,21 \times 10^6$ клеток на 1,0 мл, а в пробах с исследуемыми сыворотками концентрация клеток снижалась от $1,38 \pm 0,24$ до $0,91 \pm 0,44 \times 10^6$ кл/мл. Имеющиеся различия в содержании количества клеток после РБТЛ были статистически достоверными лишь при использовании сывороток больных с атипическими астроцитомами и протоплазматическими астроцитомами ($P < 0,05$). При морфологиче-

ском учете РБТЛ было отмечено, что сыворотки крови больных с глиобластомами и атипическими астроцитомами (IV и III степени анаплазии) обладали тормозящим действием на пролиферацию клеток. Так, при добавлении в РБТЛ этих сывороток, процент бластных клеток после реакции составлял $28,4 \pm 14,9\%$ и $38,0 \pm 2,03\%$, тогда как в контроле было $53,3 \pm 1,2\%$ ($P < 0,05$). Сы-

воротки крови больных с глиомами I и II степени анаплазии тормозили РБТЛ не существенно.

Следовательно, только сыворотки крови больных со злокачественными глиомами имели пролиферацию иммунных клеток крови при действии ФГА, что подтверждается достоверным снижением показателей РБТЛ в пробах с исследуемыми сыворотками (табл.1).

Таблица 1

Влияние сывороток крови больных с глиомами мозга на РБТЛ

	Контроль	Сыворотки крови больных			
		ФГА+ГБ	ФГА+ ААСТ	ФГА+АС	ФГА+ОАС
n	15	10	10	10	10
Количество клеток после РБТЛ ($\times 10^6$)	$1,57 \pm 0,21$	$1,38 \pm 0,24$	$1,02 \pm 0,13^*$	$0,91 \pm 0,44^*$	$1,25 \pm 0,38$
РБТЛ в %	$53,30 \pm 0,21$	$28,4 \pm 14,94^*$	$38,0 \pm 20,3^*$	$47,7 \pm 13,4$	$42,9 \pm 21,5$

* - $P < 0,05$ – в сравнении с группой контроля

При исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов после РБТЛ с ФГА с помощью панели моноклональных антител на проточном цитофлюориметре установлено, что клетки после реакции трудно гейтировать и разделять на регионы, нет четкого выделения лимфоцитарного региона, лимфоциты определяются в разных участках экрана монитора. Это потребовало подсчета содержания отдельных субпопуляций клеток после РБТЛ как в гейтированном, так и не гейтированном (upgate) режиме. Содержание отдельных субпопуляций лимфоцитов после РБТЛ показано

в таблице 2, где видно, что при исследовании в негейтированном режиме анализа, количество лимфоцитов каждой субпопуляции было значительно выше, чем в гейтированном лимфоцитарном регионе. Суммарно количество отдельных субпопуляций лимфоцитов, независимо от метода исследования, было значительно больше 100%, что указывает на то, что в процессе пролиферации лимфоидных клеток, под действием ФГА может меняться экспрессия CD-молекул на клетках или появляются клетки, на которых экспрессируется несколько дифференцировочных CD-молекул.

Таблица 2

Содержание отдельных субпопуляций лимфоцитов после РБТЛ при разных режимах исследований (в %)

Режим исследования	Значение	CD-субпопуляции лимфоцитов (в %)				
		CD-3	CD-4	CD-8	CD-16	CD-20
Гейтированный	$m \pm \sigma$ n=9	$44,7 \pm 9,96$	$37,5 \pm 5,57$	$25,28 \pm 9,031$	$32,3 \pm 10,81$	$35,0 \pm 7,75$
Не гейтированный	$m \pm \sigma$ n=9	$60,1 \pm 5,6$	$55,7 \pm 6,8$	$45,3 \pm 5,6$	$45,85 \pm 9,14$	$49,57 \pm 6,46$
P		0,005	0,004	0,007	0,004	0,009

При анализе влияния сывороток крови больных с глиомами было установлено, что эти сыворотки по-разному влияют на отдельные субпопуляции (рис.1). Так, сыворотки крови больных с глиобластомами достоверно снижали экспрессию на лимфоцитах CD-4+ и CD-8+ молекул и практически не влияли на CD-20+ и CD-16+ субпопуляции лимфоцитов, что позволяет предполагать, что они тормозили пролиферацию этих субпопуляций клеток. Сыворотки крови больных с атипическими астроцитомами III степени злокачественности угнетали про-

лиферацию CD-8+ субпопуляцию лимфоцитов. Сыворотки больных с доброкачественными I-II степени анаплазии опухолями не вызывали достоверного угнетения ни одной из субпопуляций клеток в процессе РБТЛ, хотя имеется незначительное снижение содержания клеток, которые экспрессируют CD-4+ и CD-8+ молекулы после РБТЛ. Сыворотки крови больных с астроцитомами головного мозга незначительно повышали содержание CD-20+ и CD-16+ клеток после реакции, что вероятно связано с наличием в сыворотке крови таких больных повышен-

ного уровня провоспалительных цитокинов, которые способны стимулировать пролиферацию и экспрессию рецепторов на отдельных субпопуляциях лимфоцитов [4,7].

Таким образом, на основании полученных результатов, можно сделать заключение, что лишь в сыворотках крови больных злокачественными глиальными опухолями определяются иммуносупрессивные факторы, тормозящие активацию CD-4+ и CD-8+ клеток в реакции РБТЛ. Можно предположить, что иммуносупрессивные факторы, секретируемые клетками злокачественных глиом, в частности ИЛ-10 и простагландин E-2, и другие [9,14,8], оказывают влияние не только на иммунные клетки, находящиеся в опухолевом очаге, но поступая в периферическую кровь из опухолевого очага, способны избирательно тормозить активации хелперных и цитотоксических субпопуляций Т-лимфоцитов, что подтверждено данными о снижении как уровня, так и функции Т-лимфоцитов крови у больных со злокачественными опухолями мозга [4,7,15].

ВЫВОДЫ

1. Сыворотки крови больных с глиомами тормозят пролиферацию и бласттрансформацию лимфоцитов в тесте РБТЛ с ФГА, в зависимости от степени анаплазии опухоли, что указывает на присутствие опухолевых иммуносупрессорных факторов в периферической крови.
2. Сыворотки больных со злокачественными глиомами III-IV степени анаплазии оказывают в тесте РБТЛ с ФГА статистически достоверное тормозящее влияние на пролиферацию CD-4+ и CD-8+ лимфоцитов и не влияют на CD-16+ и CD-20+ субпопуляции.
3. Сыворотки крови больных с глиомами I-II степени анаплазии не оказывают существенного влияния на содержание разных субпопуляций лимфоцитов крови после РБТЛ.
4. Иммуносупрессорные факторы, которые синтезируются злокачественными глиальными опухолями мозга, избирательно тормозят активацию хелперной и супрессорной субпопуляции лимфоцитов в организме.

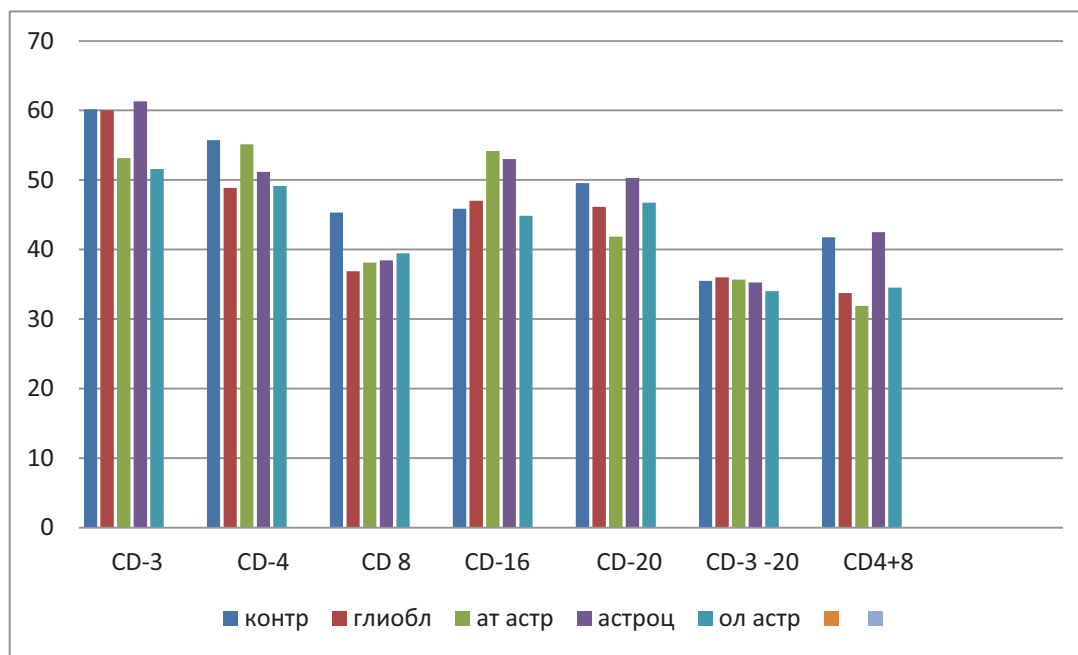


Рис 1 . Влияние сывороток крови больных с глиальными опухолями головного мозга на субпопуляционный состав лимфоцитов после РБТЛ (по вертикали – процентное содержание клеток, по горизонтали – отдельные субпопуляции лимфоцитов)

ЛИТЕРАТУРА

1 *Dunn G.P., Dunn I.F., Curry W.T.* Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma . *Cancer Immunity*. – 2007. – Vol.7, N. 12. – P. 1-24.

2. *Humphries M.D, Wei J., John H. [etal.* The Role of Tregs in Glioma-Mediated Immunosuppression: Potential Target for Intervention . *Neurosurg Clin N Am*. – 2010. – V.21. – N1. – P. 125-137.

3. *Лісяний М.І. Бельська Л.М.* Імуносупресуючий вплив злоякісних пухлин . *Укр. нейрохірург. журн.* – 2007. – №1. – С.4-9.

4. *Nduom E.K. Weller M., Heimberger A. B* Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma *Neuro Oncol* – 2015. Vol.17 №2.P 213-218

5. *Komohara Y Ohnishi K Kuratsu Jet al.* Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J. Pathol* . 2008;216(1): P.15–24

6. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Система интерлейкинов и рак.-К.: Диа.-2000.-224с.

7. Лісяний М.І., Розуменко В.Д., Скітяк С.А. Особливості імунного цитокинового статусу у хворих з гліомами головного мозку //Укр.нейрохір.журн.-2001.-№1.-С.24-31.

8. Hishii M Nitta T Ishida Het et al. Human glioma-derived interleukin-10 inhibits antitumor immune responses in vitro. Neurosurg. 1995 -vol.37 -№6 -P.1160-1166;

9. Nakano Y., Kuroda E., Kito T. et al. Induction of macrophagic prostaglandin E2 synthesis by glioma cells . J.Neurosurg.-2006.-V.104.-N4.-P.574-582.

10. Качков І.А. Бактимиров Р.Г. Захаров А.В. и др. Глиальные опухоли головного мозга: классификация, иммунопатогенез, иммунодиагностика Весник РАМН .- 2005.-№6 – с .36-41

11. Копелян І.І. Григорьева М.П. Разработка микромодификации культивирования клеток крови человека. Бюлл.эксперим.биологии и медицины.-1972.-№8.- С.119-122.

12. Лісяний Н.І. Гнедкова І.А. Потапова А.Г. Шмелева А.А. Характеристика субпопуляцій лимфоцитів крові проліферуючих в тесте бласттрансформації in vitro. Імунологія та алергологія 2015 № 3-4 с.60-63

13. Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы. Метод Рекомендации. Москва 2001, 65с.

14. Dix A.R., Brooks W.H., Roszman T.L. et al. Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. J. Neuroimmunol. - 1999. - V.10. - P.216-232

15. Jordan J.T., Sun W., Hussain S.F et al. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. Cancer Immunol Immunother .-2008.-V.57.-N.1.-P. 123-131

РЕЗЮМЕ

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИМУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ФАКТОРОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЛИОМАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ АНАПЛАЗИИ НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ

Лісяний Н.І., Гнедкова І.А., Потапова А.І., Бельская Л.Н.
 ГУ « Институт нейрохирургии им. Акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины»

Цель работы. При злокачественных глиомах головного мозга отмечаются разнонаправленные иммунные нарушения, а также синтез опухолевыми клетками иммуносупрессивных гуморальных факторов. Продукция и механизм действия гуморальных опухолевых факторов на иммунные клетки изучены недостаточно. Целью работы было изучение влияния сывороток крови больных с глиомами головного мозга разной степени анаплазии на пролиферативную активность лимфоцитов в тесте РБТЛ.

Материалы и методы. Сыворотки периферической крови 24 больных с глиомами головного мозга были разделены по степени анаплазии и гистологии глиом на 4 группы и изучались в тесте РБТЛ с ФГА. Учет РБТЛ проводился морфологическим методом, количество субпопуляций лимфоцитов определялось с помощью моноклональных CD-3,4,8,16,20 антител на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter P-500.

Результаты. Установлено, что сыворотки крови больных с глиомами 3-4 степени анаплазии вызывали статистически достоверные торможение реакции РБТЛ и пролиферации CD-4+ и CD8+ лимфоцитов. Содержание CD-16+ и CD 20+ субпопуляций лимфоцитов не изменялось при действии этих сывороток крови. Сыворотки крови больных с глиомами 1-2 степени анаплазии не тормозили реакцию РБТЛ и не влияли на пролиферативную способность лимфоцитов.

Заключение. В крови больных с глиомами мозга 3-4 степени анаплазии присутствуют факторы, подавляющие активацию CD-4+ и CD8+ субпопуляций лимфоцитов, которые ответственны за специфический противоопухолевый иммунитет.

Ключевые слова: глиальные опухоли, субпопуляции лимфоцитов, пролиферация клеток in vitro.

РЕЗЮМЕ

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ІМУНОРЕГУЛЯТОРНИХ ФАКТОРІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ХВОРИХ ГЛІОМАМИ РІЗНОГО СТУПЕНЯ АНАПЛАЗІЇ НА СУБПОПУЛЯЦІЙНИЙ СКЛАД ЛІМФОЦИТІВ

Лісяний М.І., Гнедкова І.О., Потапова А. Г., Бельська Л.М.
 ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», м. Київ

Мета роботи. При злоякісних гліомах головного мозку визначаються різноспрямовані імунні порушення, а також синтез пухлинними клітинами імуносупресивних гуморальних факторів. Продукція та механізм дії гуморальних пухлинних факторів на імунні клітини вивчені недостатньо. Метою роботи було вивчення впливу сироваток периферичної крові хворих з гліомами головного мозку різного ступеня анаплазії на проліферативну активність лімфоцитів в тесті РБТЛ.

Матеріали та методи. Сироватки крові 24 хворих з гліомами головного мозку були розділені за ступенем анаплазії і гістології пухлин на 4 групи і вивчалися в тесті РБТЛ з ФГА. Облік РБТЛ проводився морфологічним методом, кількість субпопуляцій лімфоцитів визначалося за допомогою моноклональних CD-3,4,8,16,20 антитіл методом проточної цитофлуориметрії Beckman Coulter P-500.

Результати. Встановлено, що сироватки крові хворих з гліомами 3-4 ступеня анаплазії викликали статистично достовірне гальмування реакції РБТЛ і проліферації CD-4+ та CD8+ лімфоцитів. Вміст CD-16+ і CD-20+ субпопуляцій лімфоцитів не змінювалося при дії цих сироваток крові. Сироватки крові хворих з гліомами 1-2 ступеня анаплазії не гальмували реакцію РБТЛ і не впливали на проліферативну здатність лімфоцитів крові.

Висновок. У крові хворих з гліомами мозку 3-4 ступеня анаплазії присутні фактори, які пригнічують в тесті РБТЛ активацію CD-4+ і CD8+ субпопуляцій лімфоцитів, що відповідають за специфічний протипухлинний імунітет.

Ключові слова: гліальні пухлини, субпопуляції лімфоцитів, проліферація клітин *in vitro*.

SUMMARY

STUDY OF THE EFFECT OF IMMUNOREGULATORY FACTORS OF BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH GLIOMAS OF VARYING DEGREES OF ANAPLASIA ON THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES

Lisiany N., Hniedkova I., Potapova A., Belska L.

SI «Institute of neurosurgery named after acad. A.H. Romodanov NAMS of Ukraine», Kyiv

The purpose of the study. In malignant gliomas of the brain, multidirectional immune disorders are noted, as well as by synthesis of tumor cells of immunosuppressive humoral factors. The production and mechanism of the effect of humoral tumor factors on immune cells have been studied poorly. The purpose of the study was to study the effect of blood sera in patients with brain gliomas of varying degrees of anaplasia on the proliferative activity of lymphocytes in the RBTL test.

mas of varying degrees of anaplasia on the proliferative activity of lymphocytes in the RBTL test.

Materials and methods. Blood serum of 24 patients with brain gliomas were divided into anaplasia and histology by 4 groups and studied in the RBTL test with PHA. Accounting RBTL was carried out morphologically, the number of subpopulations of lymphocytes was determined using monoclonal CD-3,4,8,16,20 antibodies on a flow cytometer.

Results. It has been established that sera from patients with gliomas of grade 3-4 anaplasia caused statistically significant inhibition of the RBTL reaction and proliferation of CD4+ and CD8+ lymphocytes. The CD-16+ and CD20+ subpopulations of the lymphocytes did not change with the action of these blood sera. Blood serum of patients with gliomas of the 1-2 degree of anaplasia did not inhibit the RBTL reaction and did not affect the proliferative capacity of lymphocytes

Conclusion. In the blood of patients with brain gliomas of 3-4 degrees of anaplasia, there are factors inhibiting the activation of CD4+ and CD8+ subpopulations of lymphocytes in the RBTL test with PHA, which responsible for specific antitumor immunity.

Key words: gliomas of the brain, subpopulations of lymphocytes, proliferation of cells *in vitro*.

АВТОРСЬКА ДОВІДКА

- **Лисяний Николай Иванович**
04050 г. Киев, ул. Платона Майбороды, 32, зав. отд. нейроиммунологии Института нейрохирургии НАМН Украины
Моб. тел.: 067-595-34-36, тел. раб. 483-81-93
E-mail: nimun.neuro@gmail.com
- **Лисяний Микола Іванович**
04050 м. Київ, вул. Платона Майбороди, 32, зав. від. нейроімунології Інституту нейрохірургії НАМН України
Моб. тел.: 067-595-34-36, тел. раб. 483-81-93
E-mail: nimun.neuro@gmail.com
- **Lisiany Mykola**
04050 Kyiv, str. Platona Mayborody, 32, Department Head of neuroimmunology department of the Institute of Neurosurgery of the National Medical Academy of Ukraine
Mob. tel.: 067-595-34-36, tel. work 483-81-93
E-mail: nimun.neuro@gmail.com
- **Гнедкова Ирина Александровна**
04050 г. Киев, ул. Платона Майбороды, 32, ст. науч. сотр. отдела нейроиммунологии Института нейрохирургии НАМНУ
Тел. раб.: +38 (044) 483-81-93
E-mail: irinagned53@ukr.net
- **Гнедкова Ірина Олександрівна**
04050 м. Київ, вул. Платона Майбороди, 32, ст. наук. співр. відділу нейроімунології Інституту нейрохірургії НАМН
Тел. роб.: +38 (044) 483-81-93
E-mail: irinagned53@ukr.net
- **Hniedkova Iryna**
04050 Kyiv, str. Platona Mayborody, 32, Senior Researcher, Neuroimmunology Department, Institute of Neurosurgery, NAMSU
Tel.: +38 (044) 483-81-93
E-mail: irinagned53@ukr.net
- **Потапова Антонина Игнатьевна**
04050 г. Киев, ул. Платона Майбороды, 32, науч. сотр. отдела нейроиммунологии Института нейрохирургии НАМНУ
Тел. раб.: +38 (044) 483-81-93
E-mail: nimun.neuro@gmail.com
- **Потапова Антоніна Гнатівна**
04050 м. Київ, вул. Платона Майбороди, 32, наук. співр. відділу нейроімунології Інституту нейрохірургії НАМНУ
Тел. роб.: +38 (044) 483-81-93
E-mail: nimun.neuro@gmail.com
- **Potapova Antonina**
04050 Kyiv, str. Platona Mayborody, 32, Researcher of Department of Neuroimmunology, Institute of Neurosurgery NAMSU
Tel.: +38 (044) 483-81-93
E-mail: nimun.neuro@gmail.com
- **Бельская Людмила Николаевна**
04050 г. Киев, ул. Платона Майбороды, 32, ст. науч. сотр. отдела нейроиммунологии Института нейрохирургии НАМНУ
Тел. раб.: +38 (044) 483-81-93
E-mail: adsg@ukr.net
- **Бельська Людмила Миколаївна**
04050 м. Київ, вул. Платона Майбороди, 32, ст. наук. співр. відділу нейроімунології Інституту нейрохірургії НАМНУ
Тел. роб.: +38 (044) 483-81-93
E-mail: adsg@ukr.net
- **Bielska Liudmyla**
04050 Kyiv, str. Platona Mayborody, 32, Senior Researcher, Neuroimmunology Department, Institute of Neurosurgery, NAMSU
Tel.: +38 (044) 483-81-93
E-mail: adsg@ukr.net