

УДК: 591.881:591.81:616-006.484-092.9



Любич Л. Д., Лісяний М. І.

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

e-mail: lyubichld@gmail.com

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СУПЕРНАТАНТУ НЕЙРОГЕННИХ КЛІТИН НА ПУХЛИНОІНДУКУЮЧУ ЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ГЛІОМИ 101.8 У ЩУРІВ

РЕЗЮМЕ

Використання нейрогенних стовбурових клітин (НСК) та нейрогенних прогеніторних клітин (НПК) є одним із напрямів клітинної терапії уражень головного та спинного мозку. Великий потенціал міграції та вбудовування НСК у місця патології в ЦНС дозволяє розглядати їх застосування в якості засобів таргетної терапії пухлин.

Метою даної роботи було вивчення дії супернатанту нейрогенних клітин (СНК) щура на пухлиноіндукуючу здатність клітин гліоми 101.8 при внутрішньомозковій імплантації щурам.

Модель гліоми 101.8 відтворювали шляхом внутрішньомозкового введення нативної або модифікованої СНК суспензії клітин гліоми штаму 101.8. СНК отримували з нейрогенних клітин мозку щура на 14-у добу гестації.

Модифікація суспензії клітин гліоми 101.8 за допомогою інкубації з СНК (0,02 та 0,1 мг/мл) знижувала пухлиноіндукуючу здатність клітин пухлини, відтермінуючи час дебюту клінічних проявів пухлинного процесу та збільшуючи тривалість життя дослідних тварин.

За умов індукції гліоми клітинами пухлини, попередньо модифікованими СНК, підвищувалась цитотоксична активність імунокомпетентних клітин тварин-носіїв пухлин в МТТ-тесті з алогенними клітинами гліоми 101.8.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гліома 101.8; супернатант нейрогенних клітин; цитотоксична функція лімфоцитів

Злоякісні гліоми головного мозку характеризуються інвазивним ростом та резистентністю до лікування і мають несприятливий прогноз для життя пацієнтів. Високозлоякісні гліоми не піддаються лікуванню за допомогою хірургічної резекції; а токсичність хіміо- і променевої терапії обмежує дози, які можуть бути використані.

Використання нейрогенних стовбурових клітин (НСК) та нейрогенних прогеніторних клітин (НПК) є одним із напрямів клітинної терапії уражень головного та спинного мозку. Інтенсивне дослідження біології НСК виявило їх пухлинотропні властивості. Великий потенціал міграції та вбудовування НСК у місця патології в ЦНС дозволяє розглядати їх застосування в якості засобів таргетної терапії пухлин [1-7]. Протипухлинні властивості НСК обґрунтовують розвиток стратегій лікування з використанням НСК при злоякісних гліомах [8-10].

Питання щодо можливих механізмів реалізації протипухлинних властивостей НСК/НПК є недостатньо вивченим; і, оскільки існують перспективи їх використання для терапії уражень мозку і злоякісних пухлин мозку, дослідження у цьому напрямку є актуальними.

Метою даної роботи було вивчення дії супернатанту нейрогенних клітин (СНК) щура на пухлиноіндукуючу здатність клітин гліоми 101.8 при внутрішньомозковій імплантації щурам.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведені на білих щурах (n = 60, самці, вага (120±10) г) розводки віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Усі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою», з урахуванням принципів біоетики та норм біологічної безпеки та були погоджені Комітетом з біоетики інституту. Тварин утримували у стандартних умовах віварію, знеболення та евтаназію проводили під ефірним наркозом.

Модель гліоми 101.8 відтворювали шляхом внутрішньомозково введення 0,02 мл ($3,5 \cdot 10^5$ життєздатних клітин) нативної або модифікованої суспензії клітин гліоми штаму 101.8 (Всеросійська колекція клітинних культур, Інститут морфології людини РАН, Москва, РФ) у ліву півкулю мозку щура на глибину 1,5-2,0 мм. Штам 101.8 являє собою анапластичну гліому, в якій одночасної малігнізації зазнали астроцитарна глія, олігодендроглія та епендима, і за своїми гістобіологічними властивостями наближається до злоякісних гліом людини [11].

Тварини були введені в експеримент одночасно та розподілені на такі групи:

1. Щури, у яких індукція гліоми проведена нативними клітинами гліоми 101.8 ($n=15$).
2. Щури, у яких індукція гліоми проведена клітинами пухлини, модифікованими СНК у концентрації 0,02 мг/мл ($n=15$).
3. Щури, у яких індукція гліоми проведена клітинами пухлини, модифікованими СНК у концентрації 0,1 мг/мл ($n=15$).
4. Інтактні щури (контроль, $n=15$).

Аналізували час настання клінічних проявів пухлинного процесу, тривалість життя дослідних тварин. На піку клінічних проявів у щурів дослідних груп вилучали селезінки для проведення імунологічних тестів (визначення цитотоксичної активності імунокомпетентних клітин).

Отримання суспензій клітин пухлини для внутрішньомозкової імплантації. На піку клінічних проявів пухлинного процесу тварин наркотизували та видаляли пухлину. Тканину пухлини промивали у середовищі DMEM (Sigma, США), звільняли від судин та оболонок, подрібнювали мікроножицями в середовищі DMEM і механічно дисоціювали багатократним піпетуванням. Клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відмивали у середовищі DMEM, до осаду клітин додавали свіже середовище DMEM, довели до необхідної концентрації та ресуспендували (нативна суспензія). Життєздатність клітин у суспензіях визначали за проникністю плазматичної мембрани для 0,2% трипанового синього (Merck, Німеччина) [18]. Для модифікації до нативних суспензій свіжовиділених клітин (2,0-106) додавали СНК (0,02 і 0,1 мг/мл) та в об'ємі 2 мл інкубували у скляних біологічно інертних центрифужних пробірках при періодичному струшуванні протягом 24 год в CO_2 -інкубаторі при температурі $37,0 \pm 0,5$ °C, постійній вологості 95% та вмісті CO_2 5%. Після завершення інкубації клітини відмивали у середовищі DMEM, до осаду додавали свіже середовище, довели до необхідної концентрації та ресуспендували.

Паралельно з цим свіжовиділені клітини пухлини в кількості $1 \cdot 10^6$ наносили на покривні адгезивні скельця, вкриті поліетиленіміном (Sigma, США), які поміщали у чашки Петрі і культивували в середовищі 199 та DMEM (1:1) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки, 4 г/л глюкози та 0,2 од/мл інсуліну (об'єм поживного середовища складав 2 мл). До дослідних культур додавали СНК (0,02 та 0,1 мг/мл) та інкубували протягом 24 год. Культури клітин тримали в CO_2 -інкубаторі (37 °C, 95% вологості та 5% CO_2) та прижиттєво спостерігали в інвертованому мікроскопі Биолам П-3 (ЛОМО, Росія) та Eclips TS 100 (Nikon, Японія) з мікрофотографічною реєстрацією.

Супернатант нейрогенних клітин (СНК) отримували при культивуванні нейрогенних клітин мозку щура, вилучених на 14-у (E14) добу гестації. Нативну тканину мозку щура, отриману в зазначений строк, звільняли від оболонок у фізіологічному розчині, переносили в середовище DMEM (Sigma, США) і суспендували багаторазовим піпетуванням. Клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відмивали у середовищі DMEM, до осаду клітин додавали свіже середовище DMEM та ресуспендували. Життєздатність клітин у суспензії визначали у стандартному цитотоксичному тесті з 0,2% трипановим синім (Merck, Німеччина). Концентрацію клітин довели до $6,0 \cdot 10^6$ /мл, до отриманої клітинної суспензії додавали мітоген конканавалін А (0,1 мг/мл) та інкубували 2 год в CO_2 -інкубаторі

при температурі $37,0 \pm 0,5$ °C, постійній вологості 95% та 5% CO_2 . Після інкубації клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відмивали у середовищі DMEM, до осаду клітин додавали свіже середовище, ресуспендували та інкубували протягом 24 год. Після інкубації клітини повторно осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відбирали супернатант, визначали у ньому концентрацію білка за методом Лоурі, стандартизували до концентрації 1,0 мг/мл і зберігали при температурі $-20 \pm 0,5$ °C.

Отримання лімфоцитів. В якості джерела імунокомпетентних клітин (зрілих лімфоцитів) використовували селезінки експериментальних тварин, яких досліджували на 17-у добу від індукції пухлини (на піку клінічних проявів). Тварин наркотизували, видаляли селезінки, готували суспензію спленоцитів шляхом механічної гомогенізації у середовищі RPMI та фільтрували через капроновий фільтр. Лімфоцити отримували центрифугуванням суспензії спленоцитів у градієнті фікол-верографіну ($d = 1,077$) при 1500 об/хв протягом 30 хв, двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином з рН = 7,2-7,4. Кількість і життєздатність отриманих клітин визначали шляхом їх підрахунку з 0,2% розчином трипанового синього (Merck, Німеччина).

Дослідження цитотоксичної активності лімфоцитів МТТ-колориметричним методом. Цитотоксичний тест проводили за стандартним протоколом [12]. Лімфоцити тварин експериментальних груп використовували в якості клітин-ефекторів ($5 \cdot 10^7$ /мл); в якості клітин-мішеней використовували клітини гліоми 101.8 ($1 \cdot 10^7$ /мл). У попередньо проведених дослідженнях з використанням співвідношень ефектор-мішень 20:1, 10:1, 5:1 було встановлено, що оптимальним є співвідношення 5:1, яке і використовувалось у даному дослідженні. Тест проводили у триплетах. Цитотоксичну активність лімфоцитів виражали цитотоксичним індексом (ЦІ) у відсотках:

$$ЦІ = 100 - \left(\frac{ОГ_{e+m} - ОГе}{ОГ_m} \right) 100\%$$

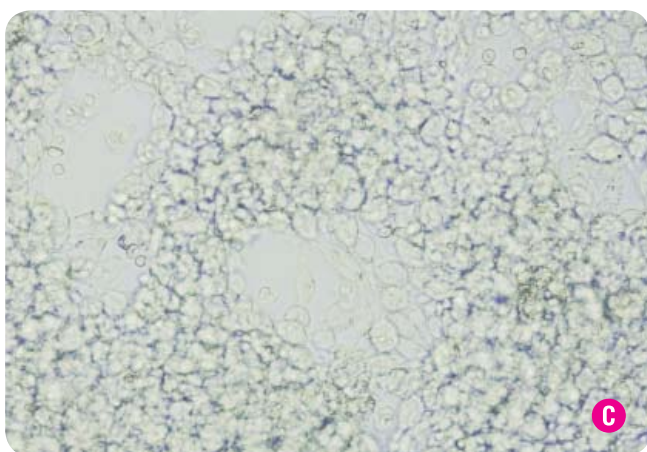
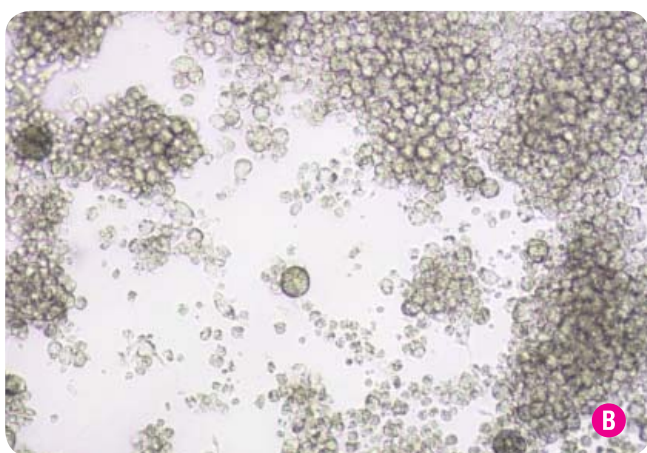
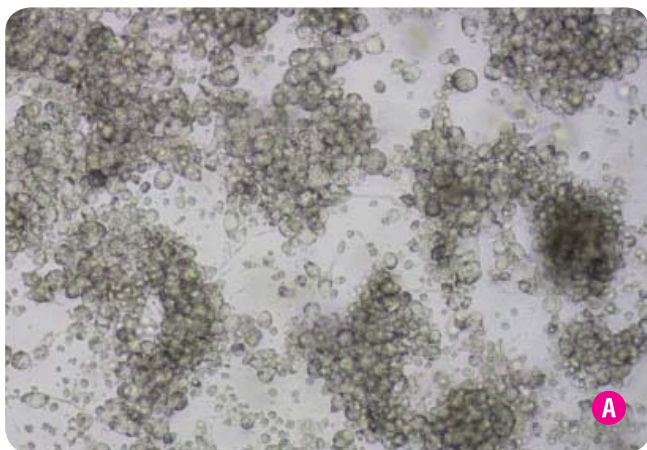
де $ОГ_{e+m}$ – значення оптичної густини в лунках ефектори+мішені;
 $ОГе$ – значення оптичної густини в лунках з ефекторами;
 $ОГ_m$ – значення оптичної густини в лунках з мішенями.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету статистичних програм «Statistica 6.0», програмне забезпечення StatSoft, Inc. (2003). Для статистичного аналізу виживаності застосовували метод множинних оцінок Каплана-Майєра з використанням критерію Вілкоксона-Гехана. Для статистичного аналізу показників цитотоксичності використовували тест ANOVA Краскела-Волліса для порівняння кількох незалежних груп та U-критерій Манна-Уїтні для парного порівняння груп. Статистично значущими вважали відмінності при $p \leq 0,05$, статистично високозначущими – при $p \leq 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інкубація клітин гліоми 101.8 у присутності СНК протягом 24 год призводила до зниження кількості та життєздатності пухлинних клітин у суспензії (відповідно на 39% та 16% при концентрації СНК 0,02 мг/мл; 52% та 17% при концентрації СНК 0,1 мг/мл). Прижиттєве спостереження за культурами в інвертованому мікроскопі показало, що інкубація з СНК викликала розрідження і деструкцію зони росту клітин гліоми 101.8 (рис. 1), що свідчить про цитотоксичну дію СНК на пухлинні клітини.

Вплив СНК на пухлиноіндукуючу здатність клітин гліоми 101.8 визначали за допомогою аналізу виживаності дослідних тварин. Застосування методу множинних оцінок Каплана-Майєра з використанням критерію Вілкоксона-Гехана виявило, що показники виживання тварин з гліомою 101.8 та різними режимами введення СНК мали статистично високозначущі відмінності (критерій χ^2 , $p = 0,000001$).



Попарне порівняння показників груп за допомогою двохвибіркового критерія Вілкоксона-Гехана дозволило виявити наступні особливості.

Модифікація клітин гліоми 101.8 за допомогою 24-год інкубації з СНК статистично високозначуще збільшувала середню тривалість життя (СТЖ) та медіану виживаності щурів-носіїв пухлин, порівняно з вказаними показниками тварин, яким перещеплення пухлини проводили нативною суспензією клітин гліоми ($p = 0,000001$; **табл. 1, рис. 2**).

Клінічні ознаки захворювання у щурів, яким внутрішньомозково вводили нативну суспензію клітин гліоми, з'являлись, починаючи з перших днів спостереження (зниження рухової активності, грумінгу). В той же час у групах тварин, яким внутрішньомозково вводили модифіковану СНК суспензію клітин гліоми, клінічні ознаки пухлинного процесу не виявлялись до 26-ї доби. Інкубація клітин гліоми з 0,02 мг/мл СНК перед внутрішньомозковим введенням щурам призводила до подовження СТЖ тварин в середньому на 13 діб та медіани виживаності на 14 діб; інкубація клітин пухлини з 0,1 мг/мл СНК відповідно призводила до подовження СТЖ тварин в середньому на 14 діб та медіани виживаності на 17 діб.

Слід зазначити, що всі тварини дослідної групи, яким перещеплення пухлини проводили нативною суспензією клітин гліоми, загинули до 23-ї доби, тоді як максимальна тривалість життя тварин-носіїв пухлин, яким внутрішньомозково вводили суспензію модифікованих СНК, становила 33 доби (модифікація 0,02 мг/мл СНК) та 38 діб (модифікація 0,1 мг/мл СНК) (**рис. 2**). Статистично значущих відмінностей між показниками виживаності тварин дослідних груп, яким перещеплення пухлини проводили клітинами, модифікованими за допомогою різних концентрацій СНК, нами не встановлено.

Таким чином, пухлиноіндукуюча здатність клітин гліоми, модифікованих СНК, значно зменшувалась, відтермінуюючи час дебюту клінічних проявів пухлинного процесу та збільшуючи тривалість життя дослідних тварин.

Порівняння показників цитотоксичної активності тварин дослідних груп за допомогою тесту ANOVA Краскела-Уолліса виявило статистично значущі відмінності між ними ($p = 0,0014$). Використаний нами варіант МТТ-тесту дає змогу визначити сумарну цитотоксичну активність ефекторних імунокомпетентних клітин – як цитотоксичних лімфоцитів, так і природних кілерів, які відіграють провідну роль у забезпеченні протипухлинного імунітету. Попарне порівняння показників груп за допомогою U-критерія Манна-Уїтні виявило наступні відмінності.

У тварин, яким індукцію пухлини проводили нативною суспензією клітин гліоми 101.8, показник цитотоксичності лімфоцитів на 17-у

Рис.1. Культура клітин гліоми 101.8 *in vitro*, світлова мікроскопія, зб. $\times 100$:

А – інкубація в стандартних умовах, 24 год;

В – інкубація в присутності СНК (0,02 мг/мл), 24 год;

С – інкубація в присутності СНК (0,1 мг/мл), 24 год.

Таблиця 1. Середня тривалість життя (СТЖ) та медіани виживаності тварин дослідних груп з гліомою 101.8

№	ГРУПА	СТЖ, ДОБИ (M + M)	50' ПРОЦЕНТИЛЬ (МЕДІАНА), ДОБИ	25' ПРОЦЕНТИЛЬ (НИЖН. КВАРТИЛЬ), ДОБИ	75' ПРОЦЕНТИЛЬ (ВЕРХ. КВАРТИЛЬ), ДОБИ	P (КРИТЕРІЙ ВІЛКОКСОНА-ГЕХАНА)
1	Індукція пухлини нативними клітинами гліоми 101.8 (n = 15)	14,6 + 2,8	14,0	12,0	17,3	-
2	Індукція гліоми клітинами пухлини, модифікованими СНК у концентрації 0,02 мг/мл (n = 15)	27,3 + 3,4	28,0	27,0	30,0	$p_{1,2} = 0,000001$
3	Індукція гліоми клітинами пухлини, модифікованими СНК у концентрації 0,1 мг/мл (n = 15)	28,3 + 5,0	31,0	26,0	33,0	$p_{1,3} = 0,000001$ $p_{2,3} = 0,6809$

добу після перещеплення пухлини статистично перевищував показник інтактних тварин (U-критерій Манна-Уїтні, $p = 0,003$, **рис. 3**).

Не дивлячись на це, протипухлинний імунітет у цих тварин виявився неефективним, оскільки тварини-носії пухлин загинули до 23-ї доби. Останнє може бути обумовлене різними механізмами, за рахунок яких гліома здатна вислизати з-під контролю імунної системи. Зокрема, до таких механізмів можуть належати: секреція гліомою імуноінгібуючих молекул для створення імуносупресивного оточення [13]; часткова або повна втрата клітинами гліоми антигенів головного комплексу гістосумісності [14-15] та компонентів механізму процесінгу антигенів [16], поява експресії неklasичних молекул комплексу гістосумісності (HLA-G, HLA-E) клітинами гліобластом та клітинами мікроглії/макрофагів, що інфільтрують пухлину [17-18].

У тварин, яким внутрішньомозково вводили суспензію клітин гліоми, модифіковану СНК у концентрації 0,02 мг/мл, цитотоксична активність імунокомпетентних клітин підвищувалась в середньому на 16%, порівняно з показником тварин-носіїв пухлин, яким вводили нативну суспензію клітин гліоми, але не до статистично значущого рівня (U-критерій Манна-Уїтні, $p = 0,066$, **рис. 3**). Поряд з тим статистично значущим виявилось зростання у тесті з клітинами пухлини ЦІ імунокомпетентних клітин щурів, яким пухлину індукували суспензією клітин гліоми, модифіковану СНК у концентрації 0,1 мг/мл (порівняно з аналогічним показником тварин з гліомою 101.8, U-критерій Манна-Уїтні, $p = 0,008$, **рис.2**); в середньому цитотоксична активність лімфоцитів підвищувалась на 21%.

Таким чином, за умов індукції гліоми клітинами пухлини, попередньо модифікованими СНК, здатність імунокомпетентних клітин тварин-носіїв пухлин чинити цитотоксичну дію на алогенні клітини гліоми у тесті *in vitro* підвищувалась.

Можна припустити, що зниження пухлиноіндукуючої здатності у клітин гліоми, модифікованої СНК, відбувається в результаті запуску у клітинах гліоми за умов впливу СНК сигнальних каскадів, що призводять до підвищення експресії антигенів МНС I класу та компонентів механізму процесінгу антигенів, що, у свою чергу, сприяє кращому розпізнаванню алогенних пухлинних клітин та, відповідно, призводить до підвищення цитотоксичної активності імунокомпетентних клітин. Це дозволяє забезпечити більш ефективну імунну відповідь проти клітин гліоми 101.8 та подовжити тривалість життя тварин-носіїв пухлин.

Крім того, інкубація з СНК, ймовірно, може запускати апоптозіндукуючі механізми у клітинах гліоми 101.8. На користь таких припущень свідчать відомі дані про те, що НПК щура можуть експресувати та продукувати спектр різних цитокінів (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, TNF- α [19-20], LIF [21]). Ймовірно є те, що у складі СНК можуть бути наявні TNF- α (може забезпечувати безпосередній цитотоксичний і цитостатичний вплив на клітини пухлини) та TGF- β 1, TGF- β 2 (проапоптозичний вплив). Останнє припущення можуть підтвердити отримані нами раніше дані про збільшення кількості клітин у термінальній стадії апоптозу (пропідіум йодид позитивні) та CD95⁺ клітин (несуть FAS-рецептор апоптозу) у короткострокових культурах анапластичних гліом людини під впливом СНК щура [22].

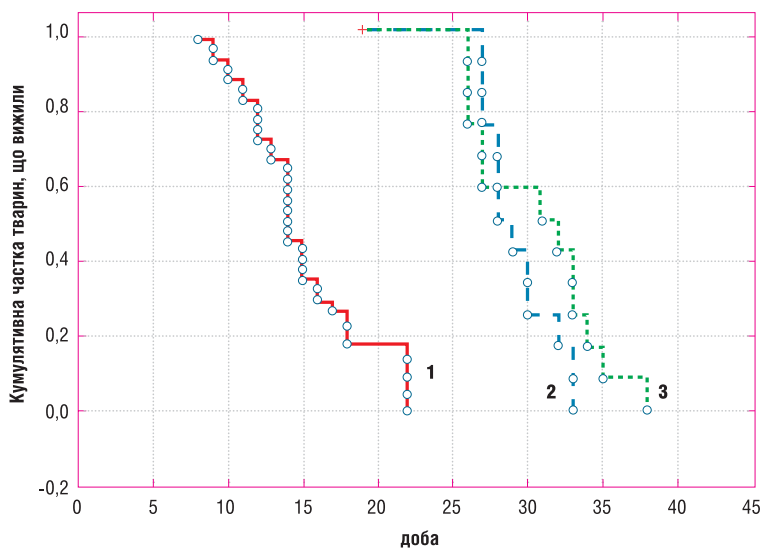


Рис.2. Криві виживаності тварин дослідних груп з гліомою 101.8:

- 1 – щури, у яких індукція гліоми проведена нативними клітинами гліоми 101.8 (n = 15);
- 2 – щури, у яких індукція гліоми проведена клітинами пухлини, модифікованими СНК у концентрації 0,02 мг/мл (n = 15);
- 3 – щури, у яких індукція гліоми проведена клітинами пухлини, модифікованими СНК у концентрації 0,1 мг/мл (n = 15).

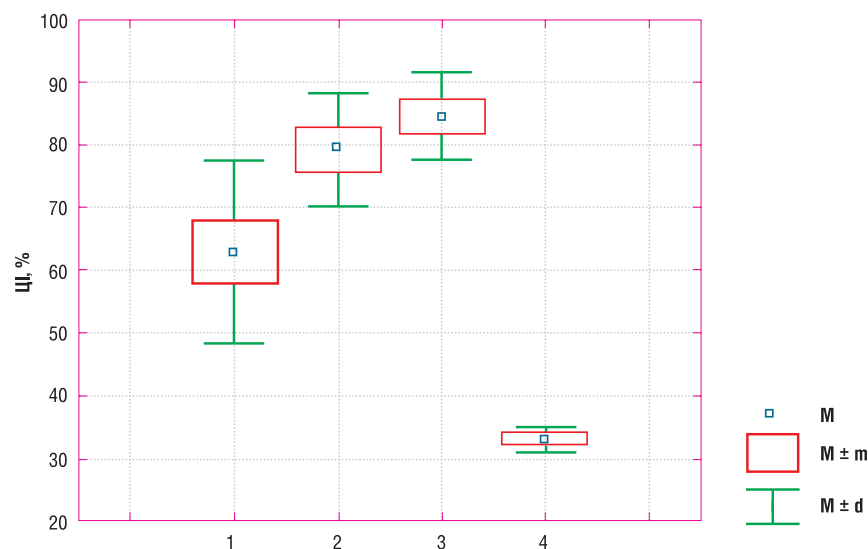


Рис.3. Цитотоксична активність мононуклеарів селезінки тварин дослідних груп по відношенню до клітин гліоми 101.8 *in vitro* (MTT-тест, цитотоксичний індекс, %):

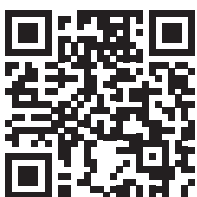
- 1 – щури, у яких індукція гліоми проведена нативними клітинами гліоми 101.8 (n=15);
- 2 – щури, у яких індукція гліоми проведена клітинами пухлини, модифікованими СНК у концентрації 0,02 мг/мл (n=15);
- 3 – щури, у яких індукція гліоми проведена клітинами пухлини, модифікованими СНК у концентрації 0,1 мг/мл (n=15);
- 4 – інтактні щури (контроль).

ВИСНОВКИ

1. Модифікація суспензії клітин гліоми 101.8 за допомогою інкубації з супернатантом нейрогенних клітин щура (в концентрації 0,02 та 0,1 мг/мл) знижувала пухлиноіндукуючу здатність клітин пухлини, відтермінуючи час дебюту клінічних проявів пухлинного процесу та збільшуючи тривалість життя дослідних тварин.
2. За умов індукції гліоми клітинами пухлини, попередньо модифікованими СНК, підвищувалась цитотоксична активність імунокомпетентних клітин тварин-носіїв пухлин в тесті *in vitro* з аlogenними клітинами гліоми 101.8.

ЛІТЕРАТУРА

1. Achanta P. Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment [Text] / P. Achanta, N. I. Sedora Roman, A. Quiñones-Hinojosa // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2010. – Vol. 10, № 2. – P. 121 – 130.
2. Kim S. U. Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors [Text] / S. U. Kim // *Stem Cell Rev.* – 2011. – Vol. 7, № 1. – P. 130 – 140.
3. Maintaining and loading neural stem cells for delivery of oncolytic adenovirus to brain tumors [Text] / A. U. Ahmed, I. V. Ulasov, R. W. Mercer, et al. // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 797. – P. 97–109.
4. Contact and encirclement of glioma cells in vitro is an intrinsic behavior of a clonal human neural stem cell line [Text] / N. Khosh, C. E. Brown, K. S. Aboody, et al. // *PLOS ONE.* – 2012. – Vol. 7, № 12. – P. e51859. – Available: <http://www.jourlib.org/paper/3003453>.
5. Neural Stem Cell–Mediated Enzyme/Prodrug Therapy for Glioma: Preclinical Studies [Text] / K. S. Aboody, J. Najbauer, M. Z. Metz, et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2013. – Vol. 5, № 184. – P. 184 – 189.
6. Bovenberg M. S. Advances in stem cell therapy against gliomas [Text] / M. S. Bovenberg, M. H. Degeling, B. A. Tannous // *Trends Mol. Med.* – 2013. – Vol. 19, № 5. – P. 281 – 291.
7. Analysis of glioblastoma tumor coverage by oncolytic virus-loaded neural stem cells using MRI-based tracking and histological reconstruction [Text] / R. A. Morshed, M. Gutova, J. Juliano, et al. // *Cancer Gene Therapy.* – 2015. – Vol. 22. – P. 55 – 61.
8. Stem cell therapeutics for cancer [Text] / Kh. Shah (ed.) // Wiley Blackwell, 2013. – 304 p.
9. Hamerlik P. Cancer stem cells and glioblastoma [Text] / P. Hamerlik / In: *Glioma cell biology*. Sedo A., Mentlein R. (ed.) // Wien: Springer-Verlag. – 2014. – P. 3 – 22.
10. Signalling cascades driving the malignant phenotype of glioma cells [Text] / M. Nakada, D. Kita, T. Furuta, et al. // In: *Glioma cell biology*. Sedo A., Mentlein R. (ed.) // Wien: Springer-Verlag. – 2014. – P. 47 – 76.
11. Халанский А. С. Новые перевиваемые глиомы головного мозга крыс [Текст] / А. С. Халанский, Л. И. Кондакова, А. П. Авцын // *Вопросы нейрохирургии.* – 1995. – Вып. № 2. – С. 23 – 25.
12. Любич Л. Д. Спосіб дослідження алоцитотоксичної активності імунокомпетентних клітин [Текст] / Л. Д. Любич, М. І. Лісяний // Патент UA 75059, Україна. Опубл. 26.11.2012. Бюл. № 2.
13. T11 target structure exerts effector function by activating immune cells in CNS against glioma where cytokine modulation provide favorable microenvironment [Text] / A. Ghosh, M. Bhattacharya, P. Sarkar, et al. // *Indian J. Exp. Biol.* – 2010. – Vol. 48, № 9. – P. 879 – 888.
14. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas [Text] / H. Huang, A. Hara, T. Homma, et al. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2005. – Vol. 64, № 10. – P. 891 – 901.
15. Immunobiological and experimental aspects of malignant astrocytoma [Text] / R. Nano, E. Capelli, A. Facoetti, et al. // *Anticancer Res.* – 2009. – Vol. 29. – P. 2461 – 2466.
16. WHO grade associated downregulation of MHC class I antigen-processing machinery components in human astrocytomas: does it reflect a potential immune escape mechanism? [Text] / M. Mehling, P. Simon, M. Mittelbronn, et al. // *Acta Neuropathol.* – 2007. – Vol. 114, № 2. – P. 111 – 119.
17. Production of immune-modulatory nonclassical molecules HLA-G and HLA-E by tumor infiltrating ameboid microglia/macrophages in glioblastomas: a role in innate immunity? [Text] / L. Kren, K. Muckova, E. Lzicarova, et al. // *J. Neuroimmunol.* – 2010. – Vol. 220, № 1-2. – P. 131 – 135.
18. Expression of immune-modulatory molecules HLA-G and HLA-E by tumor cells in glioblastomas: an unexpected prognostic significance [Text] / L. Kren, O. Slaby, K. Muckova, et al. // *Neuropathology.* – 2011. – Vol. 2. – P. 129 – 134.
19. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells [Text] / H. J. Klassen, K. L. Imfeld, I. I. Kirov, et al. // *Cytokine.* – 2003. – Vol. 22, № 3-4. – P. 101 – 106.
20. Human neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells and fetal nervous system present differences in immunogenicity and immunomodulatory potentials in vitro [Text] / J. Liu, C. Götherström, M. Forsberg, et al. // *Stem Cell Res.* – 2013. – Vol. 10, № 3. – P. 325 – 337.
21. Neural stem cells secrete factors that promote auditory cell proliferation via a leukemia inhibitory factor signaling pathway [Text] / H. C. Chen, H. I. Ma, H. K. Sytwu, et al. // *J. Neurosci. Res.* – 2010. – Vol. 88, № 15. – P. 3308 – 3318.
22. Любич Л. Д. Оцінка впливу супернатанту прогениторних нейроклітин щура на експресію антигенів CD25 та CD95 клітинами гліом людини [Текст] / Л. Д. Любич // *Імунологія та алергологія. Наука і практика* – 2012. – Вып. №2 – С. 31 – 36.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 20.03.2015 р.

Прийнята до друку 27.04.2015 р.