

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

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЛИОМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ В ТЕСТЕ РЕАКЦИИ БЛАСТТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ



Н.И. Лисяный, И.А. Гнедкова,
А.И. Потапова, Л.Н. Бельская

Адрес:

Лисяный Николай Иванович
04050, Киев, ул. Платона Майбороды, 32
ГУ «Институт нейрохирургии
им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины»
Тел.: (044) 483-81-93
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

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

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 исследование влияния сыворотки крови больных глиомами головного мозга разной степени анаплазии на пролиферативную активность лимфоцитов в тесте реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Образцы сыворотки периферической крови 26 пациентов с глиомами головного мозга были разделены по степени анаплазии и гистологической картине глиом на 4 группы и изучались в тесте РБТЛ с фитогемагглютинином. Учет РБТЛ проводили морфологическим методом, количество субпопуляций лимфоцитов определяли с помощью моноклональных CD3, 4, 8, 16, 20 антител на проточном цитофлюориметре Beckman Coulter P-500. Установлено, что сыворотка крови больных глиомами III–IV степени анаплазии вызывала статистически достоверные торможение РБТЛ и пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов. Содержание CD16⁺ и CD20⁺ субпопуляций лимфоцитов не изменялось при действии этих образцов сыворотки крови. Сыворотка крови пациентов с глиомами I–II степени анаплазии не тормозила реакцию РБТЛ и не влияла на пролиферативную способность лимфоцитов. В крови больных глиомами мозга III–IV степени анаплазии присутствуют факторы, подавляющие активацию CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций лимфоцитов, ответственных за специфический противоопухолевый иммунитет.

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 (ИЛ)-10, β-трансформирующего фактора роста, простагландинов 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 глиомами мозга определяют высокие уровни как иммуносупрессивных (ИЛ-4, -10), так и провоспалительных (ИЛ-1, -6, -8) ИЛ [4, 7–9].

Целью настоящей работы было изучение влияния на пролиферацию и субпопуляционный состав лимфоцитов крови в тесте реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) сыворотки крови пациентов с глиальными опухолями различной степени злокачественности.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы образцы сыворотки периферической крови 26 больных глиальными опухолями головного мозга различной степени злокачественности: глиобластомами (IV степень анаплазии) — 8, атипическими астроцитомами (III степень анаплазии) — 7, фибриллярно-протоплазматическими астроцитомами (I–II степень анаплазии) — 5, олигоастроцитомами (I–II степень анаплазии) — 6. Сыворотку получали из крови, взятой для гематологического планового обследования пациентов перед операцией, и хранили при t –20 °C. По-

сле установления гистологического типа опухоли, согласно принятой классификации [10], образцы сыворотки крови больных объединяли, а далее разделяли в зависимости от степени злокачественности новообразования на 4 группы: сыворотки глиобластом и атипических астроцитом, астроцитом и олигоастроцитом, которые использовали в дальнейших исследованиях в тесте пролиферации лимфоцитов крови в РБТЛ в присутствии фитогемагглютинаина (ФГА). 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 сывороткой с антибиотиком гентамицином. В качестве стимулятора пролиферации использовали 100,0 мкл 0,1% раствора ФГА (фирмы Sigma). В опытные пробы добавляли по 100,0 мкл сыворотки крови больных глиомами мозга определенной гистоструктуры, в контрольный образец РБТЛ — 100,0 мкл сыворотки крови доноров.

Учет РБТЛ производили через 72 ч 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 (CD3, 4, 8, 16, 20) моноклональных антител (Becton Dickinson), согласно рекомендациям, к антителам на проточном цитофлюориметре Beckman Coulter P-500 [13].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании количества ядросодержащих клеток после проведения РБТЛ с ФГА установлено, что изучаемые образцы сыворотки крови обладали способностью тормозить пролиферацию клеток (табл. 1). Так, в контроле РБТЛ с ФГА + сыворотка доноров количество ядросодержащих клеток составляло $1,57 \pm 0,21 \cdot 10^6$ клеток на 1,0 мл, а в пробах с исследуемой сывороткой больных концентрация клеток снижалась от $1,38 \pm 0,24$ до $0,91 \pm 0,44 \cdot 10^6$ клеток/мл. Имеющиеся различия в содержании клеток после РБТЛ были статистически достоверными лишь при использовании сыворотки пациентов с атипическими астроцитомами и протоплазматическими астроцитомами ($p < 0,05$). При морфологическом учете РБТЛ отмечено, что сыворотка крови больных глиобластомами и атипическими астроцитомами (IV и III степени анаплазии) обладала тормозящим действием на пролиферацию клеток. Так, при добавлении в РБТЛ

сыворотки этих пациентов количество бластных клеток после реакции составляло $28,4 \pm 14,9$ и $38,0 \pm 2,03\%$, тогда как в контроле — $53,3 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$). Сыворотка крови больных глиомами I и II степени анаплазии тормозила РБТЛ несущественно.

Следовательно, только сыворотка крови пациентов со злокачественными глиомами тормозит пролиферацию иммунных клеток крови при действии ФГА, что подтверждается достоверным снижением показателей РБТЛ в пробах с исследуемыми образцами (см. табл. 1).

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 негейтированном (upgate) режиме. Содержание отдельных субпопуляций лимфоцитов после РБТЛ представлено в табл. 2, где видно, что при исследовании в негейтированном режиме анализа количество лимфоцитов каждой субпопуляции было значительно больше, 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.

При анализе влияния сыворотки крови больных глиомами установлено ее различное воздействие на отдельные субпопуляции лимфоцитов (рисунок). Так, сыворотка крови пациентов с глиобластомами достоверно снижала экспрессию на лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ молекул и практически не влияла на CD20⁺ и CD16⁺ субпопуляции лимфоцитов,

что позволяет предполагать, что данные образцы тормозили пролиферацию этих субпопуляций клеток. Сыворотка крови больных атипическими астроцитомами III степени злокачественности угнетала пролиферацию CD8⁺ субпопуляций лимфоцитов. Наличие сыворотки пациентов с доброкачественными опухолями I–II степени анаплазии не вызвало достоверного угнетения ни одной из субпопуляций клеток в процессе РБТЛ, хотя отмечено незначительное снижение содержания клеток, экспрессирующих CD4⁺ и CD8⁺ молекулы после РБТЛ. Сыворотка крови больных астроцитомами головного мозга незначительно повышала содержание CD20⁺ и CD16⁺ клеток после реакции, что, вероятно, связано с наличием в сыворотке крови таких пациентов повышенного уровня провоспалительных цитокинов, способных стимулировать пролиферацию и экспрессию рецепторов на отдельных субпопуляциях лимфоцитов [4, 7].

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать заключение, что лишь в образцах сыворотки крови больных со злокачественными глиальными опухолями определяются иммуносупрессивные факторы, тормозящие активацию CD4⁺ и CD8⁺ клеток в РБТЛ. Можно предположить, что иммуносупрессивные факторы, секретируемые клетками злокачественных глиом, в частности ИЛ-10 и простагландин Е-2 и другие [8, 9, 14], не только оказывают влияние на иммунные клетки, находящиеся в опухолевом очаге, но, поступая в периферическую кровь из него, способны избирательно тормозить активацию хелперных и цитотоксических субпопуляций Т-лимфоцитов, что подтверждено данными о снижении как уровня, так и функции Т-лимфоцитов в крови у пациентов со злокачественными образованиями мозга [4, 7, 15].

ВЫВОДЫ

1. В тесте пролиферации лимфоцитов в крови *in vitro* с ФГА (РБТЛ-тест) в течение 72 ч происходит увеличение количества как CD20⁺ и CD16⁺, так и CD3⁺ клеток, что свидетельствует о способности

Таблица 1. Влияние сыворотки крови больных глиомами мозга на РБТЛ

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

* $p < 0,05$ в сравнении с группой контроля. ГБ – глиобластомы; ААСТ – атипические астроцитомы; АС – астроцитомы; ОАС – олигоастроцитомы.

Таблица 2. Содержание отдельных субпопуляций лимфоцитов после РБТЛ при разных режимах исследований

Режим исследования	Значение	CD-субпопуляции лимфоцитов, %				
		CD3	CD4	CD8	CD16	CD20
Гейтированный	$m \pm \delta$ (n=9)	$44,7 \pm 9,96$	$37,5 \pm 5,57$	$25,28 \pm 9,031$	$32,3 \pm 10,81$	$35,0 \pm 7,75$
Негейтированный	$m \pm \delta$ (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

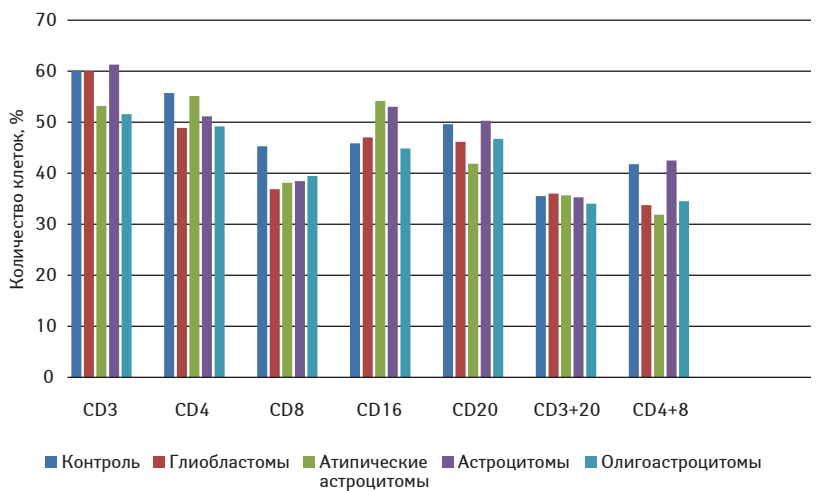


Рисунок. Влияние сыворотки крови больных глиальными опухолями головного мозга на субпопуляционный состав лимфоцитов после РБТЛ

этого митогена стимулировать пролиферацию разных субпопуляций лимфоцитов.

2. Сыворотка крови больных глиомами головного мозга тормозит пролиферацию и бласттрансформацию лимфоцитов в тесте РБТЛ с ФГА в зависимости от степени анаплазии опухоли.

3. Сыворотка крови пациентов со злокачественными глиомами III–IV степени анаплазии оказывает в тесте РБТЛ с ФГА статистически достоверное тормозящее влияние на пролиферацию

CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов и не воздействует на CD16⁺ и CD20⁺ субпопуляции.

4. Сыворотка крови больных глиомами I–II степени анаплазии не оказывает существенного влияния на содержание разных субпопуляций лимфоцитов в крови после РБТЛ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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

2. Humphries W., Wei J., Sampson J.H., Heimberger A.B. (2010) The role of tregs in glioma-mediated immunosuppression: potential target for intervention. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 21(1): 125–137.

3. Лисяний М.І., Бельська Л.М. (2007) Імунопресуючий вплив злоякісних пухлин. *Укр. нейрохірург. журн.*, 1: 4–9.

4. Nduom E.K., Weller M., Heimberger A.B. (2015) Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro. Oncol.*, 17(2): 213–218.

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

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

7. Лисяний М.І., Розуменко В.Д., Скитяк С.А. (2001) Особливості імунного цитокінового статусу у хворих з глиомами головного мозку. *Укр. нейрохір. журн.*, 1: 24–31.

8. Hishii M., Nitta T., Ishida H. et al. (1995) Human glioma-derived interleukin-10 inhibits antitumor immune responses *in vitro*. *Neurosurg.*, 37(6): 1160–1166.

9. Nakano Y., Kuroda E., Kito T. et al. (2006) Induction of macrophagic prostaglandin E2 synthesis by glioma cells. *J. Neurosurg.*, 104(4): 574–582.

10. Качков І.А., Бактимиров Р.Г., Захаров А.В. и др. (2005) Глиальные опухоли головного мозга: классификация, иммунопатогенез, иммунодиагностика. *Вестник РАМН*, 6: 36–41.

11. Копелян І.І., Григорьева М.П. (1972) Разработка микромодификации культивирования клеток крови человека. *Биол. эксперим. биологии и медицины*, 8: 119–122.

12. Лисяний Н.І., Гнедкова І.А., Потапова А.Г., Шмелева А.А. (2015) Характеристика субпопуляцій лимфоцитів крові проліферуючих в тесте бласттрансформації *in vitro*. *Імунологія та алергологія*, 3–4: 60–63.

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

14. Dix A.R., Brooks W.H., Roszman T.L. et al. (1999) Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J. Neuroimmunol.*, 10: 216–232.

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

Вивчення впливу гуморальних факторів крові хворих на глиоми головного мозку на субпопуляційний склад лімфоцитів у тесті реакції бласттрансформації лімфоцитів

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

Резюме. При злоякісних глиомах головного мозку визначаються різноспрямовані імунні порушення, а також синтез пухлинними клітинами імуносупресивних гуморальних факторів. Продукція та механізм дії гуморальних пухлинних факторів на імунні клітини вивчено недостатньо. Метою роботи було вивчення впливу сироватки периферичної крові хворих на глиоми головного мозку різного ступеня анаплазії на проліферативну активність лімфоцитів в тесті реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ). Зразки сироватки крові 26 пацієнтів з глиомами головного мозку розподілили за ступенем анаплазії та гістологічною картиною пухлин на 4 групи і вивчали в тесті РБТЛ з фітогемаглютиніном. Облік РБТЛ проводили морфологічним методом, кількість субпопуляцій лімфоцитів визначали за допомогою моноклональних CD3, 4, 8, 16, 20 антигенів на проточному цитофлуориметрі Beckman Coulter P-500. Встановлено, що сироватка крові хворих на глиоми III–IV ступеня анаплазії викликали статистично достовірне гальмування РБТЛ і проліферації CD4⁺ та CD8⁺ лімфоцитів. Вміст CD16⁺ і CD20⁺ субпопуляцій лімфоцитів не змінювався при дії цих зразків сироватки крові. Сироватка крові пацієнтів з глиомами I–II ступеня анаплазії не гальмувала РБТЛ і не впливала на проліферативну здатність лімфоцитів. У крові хворих на глиоми мозку III–IV ступеня анаплазії присутні фактори, які пригнічують в тесті РБТЛ активацію CD4⁺ і CD8⁺ субпопуляцій лімфоцитів, що відповідають за специфічний протипухлинний імунітет.

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

Study of the influence of humoral factors of blood of patients with brain gliomas on the subpopulation of lymphocytes in the reaction of lymphocytes blast transformation test

M.I. Lisianyi, I.O. Gniedkova, A.G. Potapova, L.M. Belska
SI «Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov of the NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. 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 reaction of lymphocytes blast transformation (RLBT) test. Blood serum of 26 patients with brain gliomas were divided into anaplasia and histology by 4 groups and studied in the RLBT test with phytohemagglutinin (PHA). Accounting RLBT was carried out morphologically, the number of subpopulations of lymphocytes was determined using monoclonal CD3, 4, 8, 16, 20 antibodies on a flow cytometer. It has been established that sera from patients with gliomas of grade III–IV anaplasia caused statistically significant inhibition of the RLBT reaction and proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. The CD16⁺ and CD20⁺ subpopulations of the lymphocytes did not change with the action of these blood sera. Blood serum of patients with gliomas of the I–II degree of anaplasia did not inhibit the RLBT reaction and did not affect the proliferative capacity of lymphocytes. In the blood of patients with brain gliomas of III–IV degrees of anaplasia, there are factors inhibiting the activation of CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations of lymphocytes in the RLBT test with PHA, which responsible for specific antitumor immunity.

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