

Вплив супернатанта прогеніторних нейроклітин на цитотоксичну функцію лімфоцитів у щурів з гліомою

Л.Д. Любич, М.І. Лісяний

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»;
E-mail: lyubichld@gmail.com

Вивчали дію супернатанта прогеніторних нейроклітин (СНК) на цитотоксичну функцію лімфоцитів у щурів за умов фізіологічної норми та експериментально змодельованого пухлинного процесу (гліома головного мозку, штамп 101.8). Дослідження проведені у тварин з первитою пухлиною без введення СНК, а також з різними режимами його введення (трикратно з 5-ї по 10-ту добу після перевивання гліоми, а також попередньо за тиждень та за місяць до перевивання). До груп порівняння ввійшли щури без гліоми, яким трикратно вводили СНК, та інтактні тварини (контроль). СНК отримували з суспензії нейрогенних прогеніторних клітин (НПК) мозку щура на 14-ту добу гестації та вводили внутрішньоочеревинно (0,12 мг білка на тварину). Цитотоксичну функцію лімфоцитів щурів експериментальних груп вивчали за допомогою МТТ-колориметричного тесту з аlogenними клітинами гліоми. Введення СНК підвищувало цитотоксичну активність лімфоцитів in vitro стосовно аlogenних пухлинних клітин як у інтактних тварин (на 37–38%), так і у щурів з гліомою (на 11–22%). За умов впливу СНК збільшувалася середня тривалість життя і медіана виживаності тварин-носіїв пухлини (у середньому на 3–4 доби). Режими введення СНК трикратно з 5-ї по 10-ту добу після перевивання гліоми та за тиждень до перевивання були найбільш ефективними. Таким чином, встановлено опосередкований пухлинопригнічувальний ефект при внутрішньоочеревинному введенні СНК щурам з гліомою, що, очевидно, зумовлено підвищенням ефективності цитотоксичної функції імункомпетентних клітин тварин з первитою пухлиною під впливом продукованих НПК факторів.

Ключові слова: цитотоксична функція лімфоцитів; гліома 101.8; супернатант прогеніторних нейроклітин.

ВСТУП

Важливою проблемою імунології злоякісних пухлин і, зокрема, гліом головного мозку є визначення механізмів їх «вислизання» з-під нагляду імунної системи та її пригнічення. Відомо, що при гліомах – найбільш загальних первинних пухлинах мозку, які характеризуються інфільтративним ростом, резистентністю до лікування і мають несприятливий прогноз для життя пацієнтів, виявляються зміни у всіх ланках імунітету [1]. Гліома формує імуносупресивне оточення секрецією різних молекул (простагландину E2, інтерлейкіну-10 – IL-10, трансформую-

чого ростового фактора β – TGF- β , гангліозидів) для послаблення імунної відповіді [2]. Поряд зі зниженням кількості та функції імункомпетентних клітин (відносна та абсолютна лімфопенія, знижений вміст лімфоцитів CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, HLA-DR⁺-клітин, гальмування проліферативної здатності лімфоцитів, зниження секреції ефекторних цитокінів), підвищується кількість Т-регуляторних клітин CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, що продукують імуноінгібувальні медіатори [3]. При гліомах, особливо злоякісних, відбувається часткова або повна втрата клітинами пухлин експресії антигенів I та/або II класу головно-

© Л.Д.Любич, М.І.Лісяний

го комплексу гістосумісності (МНС) [4,5], зниження експресії компонентів механізму їх процесингу (транспортних молекул LMP2, TAP1 та β 2-мікроглобуліну) [6], поява неklasичних молекул HLA-G та HLA-E з імуномодулювальною дією клітинами гліобластом і мікроглією/макрофагами, які інфільтрують пухлину [7,8], що сприяє уникненню гліомами контролю з боку імунної системи.

Актуальним підходом у лікуванні гліом мозку є використання нейрогенних стовбурових і прогеніторних клітин (НСК, НПК відповідно), а також їх компонентів і продуктів, що демонструють протипухлинні властивості [9–11]. Це пов'язано зі здатністю НСК до міграції та вбудовування у місця патології в ЦНС [10,12,13]. У зв'язку з цим їх розглядають як вектори для генно-клітинної терапії пухлин мозку [10–12]. Одним із можливих механізмів реалізації протипухлинних властивостей НСК є індукція ефективної імунної відповіді проти внутрішньомозкових пухлин, у якій провідне місце належить $CD8^+T^-$, $CD4^+T^-$ і NK-клітинам.

Недостатньо вивчено питання щодо імуномодулювального потенціалу НСК/НПК, особливо їх гуморальних чинників. Оскільки існують перспективи використання НСК/НПК для терапії злоякісних пухлин мозку, дослідження у цьому напрямку є актуальними.

Метою нашої роботи було визначення впливу супернатанта прогеніторних нейроклітин (СНК) на цитотоксичну функцію лімфоцитів у щурів за умов фізіологічної норми та експериментально змодельованого пухлинного процесу (гліома головного мозку, штам 101.8).

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на білих щурах-самцях масою 120 ± 10 г (віварій ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»). Усі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриман-

ням 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 ДУ «ІНХ НАМН».

Тварини були введені в експеримент одномоментно та розподілені на 6 груп по 12 тварин у кожній. До першої групи ввійшли щури з перевитою гліомою без введення СНК; до другої - з трикратним введенням СНК з 5-ї по 10-ту добу після перевивання пухлини; до третьої і четвертої - щури, яким трикратно вводили СНК попередньо за тиждень і за місяць відповідно до перевивання гліоми; до п'ятої – тварини без пухлини, яким трикратно вводили СНК; до шостої - інтактні щури (контроль).

Модель гліоми відтворювали внутрішньомозковим введенням 0,02 мл ($3,5 \cdot 10^5$) суспензії клітин гліоми штаму 101.8 (Всеросійська колекція клітинних культур, Інститут морфології людини РАН, Москва) у ліву півкулю мозку щура на глибину 1,5–2,0 мм. Цей штам являє собою анапластичну гліому, в якій одночасної малігнізації зазнали астроцитарна глія, олігодендроцити та епендима, і за своїми гістобіологічними властивостями наближається до злоякісних гліом людини [14].

СНК отримували при культивуванні нейрогенних клітин мозку щура, вилучених на 14-ту добу гестації. Нативну тканину мозку щура, звільняли від оболонок у фізіологічному розчині, переносили в середовище DMEM («Sigma», Німеччина) і суспендували багаторазовим піпетуванням. Клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відмивали у середовищі DMEM, до осаду клітин додавали свіже середовище та ресуспендували. Життєздатність клітин у суспензії визначали у стандартному цитотоксичному тесті з 0,2%-м трипановим синім («Merck», Німеччина). Концентрацію клітин доводили до $6,0 \cdot 10^6$ /мл, до отриманої

клітинної суспензії додавали конканавалін А (0,10 мг/мл) та інкубували 2 год в CO₂-інкубаторі при 37,0±0,5°C, постійній вологості 95% та 5% CO₂. Після цього 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. Потім їх повторно осаджували центрифугуванням упродовж 5 хв при 1500 хв⁻¹, відбирали супернатант, визначали у ньому концентрацію білка за методом Лоурі, стандартизували до концентрації 1,0 мг/мл, аліквотизували і зберігали при -20±0,5°C. СНК експериментальним тваринам вводили внутрішньоочеревинно, сумарна доза становила 0,12 мг на тварину (за концентрацією білка).

Джерелом імунокомпетентних клітин (зрілих лімфоцитів) була селезінка тварин, яких досліджували на 17-ту добу від перевищення пухлини (на піку клінічних проявів). Інтактних тварин, яким трикратно вводили СНК, досліджували, відповідно, через тиждень після останньої ін'єкції. Тварин наркотизували, видаляли селезінки, готували суспензію спленоцитів механічною гомогенізацією у середовищі RPMI та фільтрували через капроновий фільтр. Лімфоцити отримували центрифугуванням суспензії спленоцитів у градієнті фіколу-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 у цитотоксичному тесті з 0,2%-м розчином трипанового синього ("Merch", Німеччина).

Отримані лімфоцити досліджували у цитотоксичному тесті з 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромідом (МТТ-тест), який проводили за протоколом [15]. Лімфоцити тварин експериментальних груп використовували як клітини-ефектори (5·10⁷/мл); клітини гліоми 101.8 (1·10⁷/мл) - як клітини-мішені. Оптимальне співвідношення ефектор-мішень було виявлено у попередніх

експериментах і становило 5:1. Тест проводили у триплетах. Цитотоксичну активність лімфоцитів виражали цитотоксичним індексом (ЦІ) у відсотках:

$$\text{ЦІ} = 100 - \left(\frac{\text{ОГ}_{\text{е+м}} - \text{ОГ}_{\text{е}}}{\text{ОГ}_{\text{м}}} \cdot 100 \right) \%,$$

де ОГ – оптична густина: ОГ_{е+м} – в лунках з ефекторами і мішенями; ОГ_е – в лунках з ефекторами; ОГ_м – в лунках з мішенями.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакету програм Statistica 6.0. Застосовували параметричні та непараметричні методи варіаційної статистики. Нормальність розподілу результатів визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності при P<0,05, статистично високозначущими – при P<0,01.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Порівняння цитотоксичної активності тварин дослідних груп за допомогою тесту ANOVA Краскела-Уолліса виявило статистично високозначущі відмінності між ними (P=0,0009). Попарне порівняння показників груп за допомогою U-критерію Манна-Уїтні дало змогу виявити наступні особливості. Цитотоксична активність лімфоцитів інтактних щурів (шоста група, контроль) у МТТ-тесті з клітинами гліоми (у алогенній системі) становила 33,23±1,13 %. Внутрішньоочеревинне введення СНК здоровим тваринам без гліоми (п'ята група) підвищувало ЦІ імунокомпетентних клітин до статистично значущого рівня (U-критерій, P=0,016; рис.1); в середньому цитотоксична активність лімфоцитів збільшувалася на 37-38 %.

У щурів з перевитою гліомою (перша група) показник цитотоксичності лімфоцитів становив 63,07±11,05 %, перевищуючи такий у інтактних тварин (U-критерій, P=0,003; див. рис.1). У тварин другої групи цитотоксична активність імунокомпетентних клітин зростала, порівняно з показником тварин першої

групи, але не до статистично значущого рівня (U-критерій, $P=0,24$; див. рис.1); в середньому вона підвищувалася на 11–12 %.

Цікавим виявилось збільшення ЦІ у тесті з клітинами пухлини імунокомпетентних клітин щурів третьої групи (статистично значуще, порівняно з аналогічним показником тварин першої групи, U-критерій, $P=0,009$; див. рис.1); в середньому цитотоксична активність лімфоцитів підвищувалася на 21–22 %. На відміну від показників тварин третьої групи, ЦІ імунокомпетентних клітин щурів четвертої групи виявився нижчим, ніж у інших дослідних групах (U-критерій, $P=0,02$ – $0,09$; див. рис.1).

Ефективність режимів введення СНК тваринам з гліомою визначали за допомогою аналізу виживаності. Застосування методу множинних оцінок Каплана-Мейєра з використанням критерію Вілкоксона-Гехана виявило, що показники виживаності тварин з гліомою та різними режимами введення СНК мали статистично високочисельні від-

мінності (критерій χ^2 , $P=0,00043$). Попарне порівняння показників груп за допомогою двовибіркового критерія Вілкоксона-Гехана дало змогу виявити такі особливості.

У щурів другої групи статистично високочисельно збільшувалася середня тривалість життя (СТЖ) і медіана виживаності порівняно з тваринами першої групи (таблиця, рис. 2). У щурів третьої та четвертої груп також рис.2). При цьому максимальна тривалість життя тварин першої групи становила 22 доби, другої групи – 40, третьої – 32, четвертої – 25 діб (рис.2). Отже, найбільш значуще на виживаність щурів з гліомою впливали режими введення СНК трикратно з 5-ї по 10-ту добу після перевивання пухлини та за тиждень до її перевивання. Вказані режими виявились ефективними у підвищенні здатності імунокомпетентних клітин тварин-носіїв пухлини чинити цитотоксичну дію на алогенні клітини гліоми у тесті *in vitro*.

Як наведено вище, у щурів-носіїв гліоми цитотоксична функція лімфоцитів не

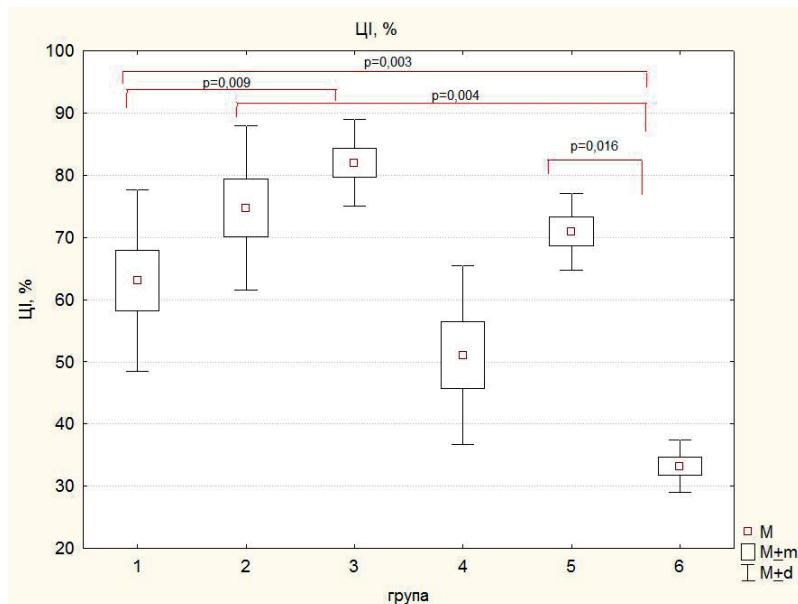


Рис. 1. Цитотоксична активність лімфоцитів тварин дослідних груп відносно клітин гліоми 101.8 *in vitro* (МТТ-тест, цитотоксичний індекс – ЦІ): 1 – щури з перевитою гліомою без введення супернатанта нейроклітин (СНК); 2 – введення СНК з 5-ї по 10-ту добу після перевивання гліоми; 3 і 4 – введення СНК за тиждень і місяць відповідно до перевивання гліоми; 5 – введення СНК щурам без гліоми; 6 – контроль. М – середнє значення; m – стандартна похибка середнього значення; d – стандартне відхилення від середнього значення.

Середня тривалість життя (СТЖ) та медіани виживаності тварин дослідних груп з гліомою штаму 101.8

Схема досліду	СТЖ, доби ($M \pm m$)	50' процентиль (медіана), доби	25' процентиль (нижній квар- тиль), доби	75' процентиль (верхній квар- тиль), доби	P (критерій Вілкоксона-Ге- хана)
Гліома	$14,6 \pm 2,8$	14,0	12,0	17,3	-
Гліома та наступне трикрат- не введення супернатанта прогеніторних нейроклітин (СНК)	$18,9 \pm 3,7$	18,0	15,0	18,7	0,00023
Гліома з попереднім за ти- ждень до перевивання пух- лини трикратним введенням СНК	$18,4 \pm 3,1$	18,0	15,0	20,7	0,01443
Гліома з попереднім за місяць до перевивання пухлини три- кратним введенням СНК	$17,7 \pm 2,2$	17,0	15,0	20,5	0,00429

Примітка: M – середнє значення; m – стандартне відхилення від середнього значення.

є зниженою, навпаки, ЦІ був вищим, ніж у інтактних щурів. Але оскільки тварини-пухлиносії загинули до 23-ї доби, очевидно, що протипухлинний імунітет у цих тварин є неефективним. Це може бути зумовлене різними механізмами, за допомогою яких гліома уникає контролю імунної системи. До них відносять створення імуносупресивного оточення секретованими гліомою імуноінгібувальними молекулами [2]; часткову або повну втрату клітинами гліоми антигенів МНС [4,5] та компонентів механізму їх процесингу [6], появу експресії некласичних молекул комплексу гістосумісності клітинами гліобластом і мікроглією/макрофагами, що інфільтрують пухлину [7,8].

Слід вказати, що застосована нами модифікація МТТ-тесту дає можливість визначити сумарну цитотоксичну активність ефекторних імунокомпетентних клітин – як цитотоксичних лімфоцитів, так і природних кілерів. Імовірно, за умов впливу СНК у ефекторних клітинах імунної системи запускаються сигнальні каскади, які призводять до підвищення експресії антигенів МНС I класу та компонентів механізму їх процесингу, що сприяє кращому розпізнаванню алогенних

пухлинних клітин і, відповідно, призводить до підвищення цитотоксичної активності імунокомпетентних клітин. Оскільки зазначені клітини імунної системи (цитотоксичні лімфоцити та природні кілери) відіграють провідну роль у забезпеченні протипухлинного імунітету, можна припустити, що внутрішньоочеревинне введення СНК щура індукує більш ефективну імунну відповідь проти клітин гліоми, забезпечуючи реалізацію протипухлинних властивостей НПК, і даючи змогу подовжити тривалість життя тварин-пухлиноносіїв.

Слід зазначити, що такий ефект СНК має певні обмеження у тривалості. Його введення за місяць до перевивання пухлини подовжувало тривалість життя тварин на 3 доби, за тиждень – на 4 доби (максимальна тривалість життя 25 і 32 доби відповідно). Введення СНК з 5-ї по 10-ту добу після перевивання гліоми подовжувало тривалість життя тварин на 4,2 доби (максимальна тривалість життя – 40 діб). Оскільки цитотоксична активність лімфоцитів селезінки на 17-ту добу після перевивання пухлини у тварин, яким вводили СНК за тиждень до її індукції та з 5-ї по 10-ту добу після цього, була вірогідно підвищеною,

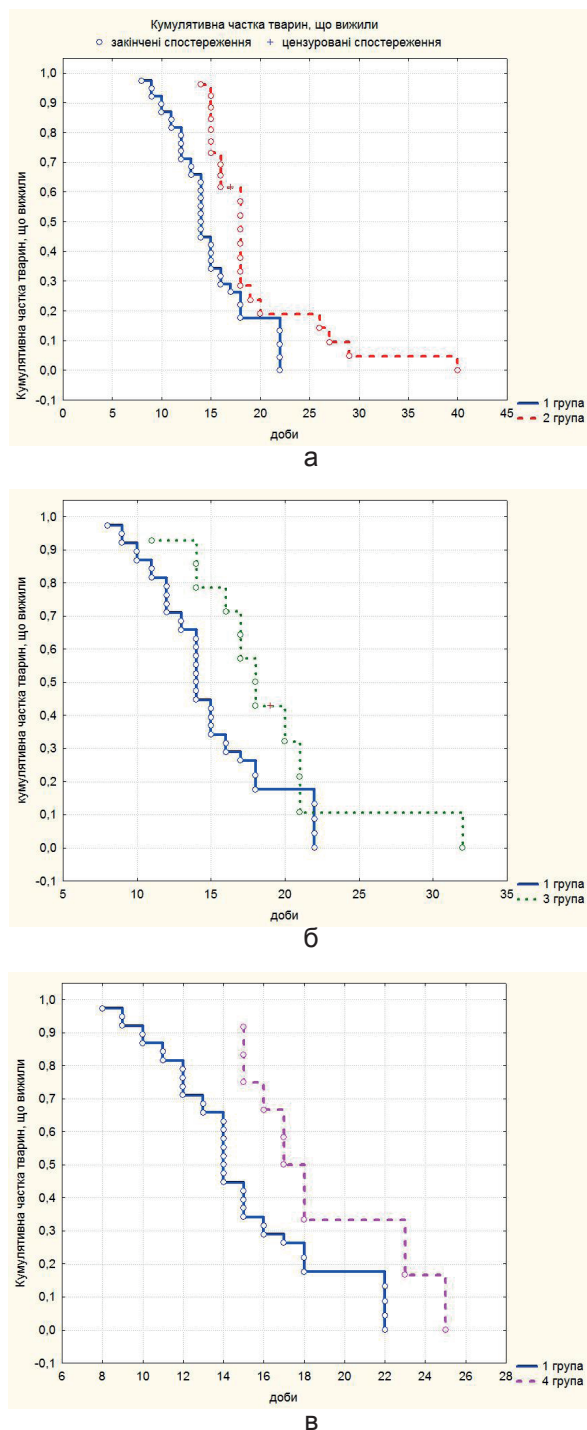


Рис.2. Криві виживаності тварин дослідних груп з гліомою: 1 – щури з перевитою гліомою без введення супернатанта нейроклітин (СНК); 2 – введення СНК з 5-ї по 10-ту добу після перевивання гліоми; 3 і 4 – введення СНК за тиждень і за місяць відповідно до перевивання гліоми

на відміну від тварин, яким вводили СНК за місяць до моделювання пухлинного процесу, можна припустити, що максимальний активуючий ефект СНК на імунокомпетентні клітини селезінки триває протягом 7–20 діб.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників. Відомо, що НПК можуть мігрувати до гліобластом та індукувати загибель клітин пухлини у мишей та щурів [11]; пролонгувати виживання тварин або майже повністю інгібувати ріст гліоми [13]. Мультипотентні НПК людини, щура і миші експресують і продукують досить широкий набір цитокінів [16–18]. Генетична модифікація НСК терапевтичними цитокінами посилювала протипухлинний ефект і подовжувала термін виживання тварин-пухлиноносіїв. Зокрема, НСК з трансфікованим геном IL-12, а також НПК, генетично сконструйовані до продукції IL-23, мали виражений протипухлинний ефект: збільшували термін виживання тварин-носіїв внутрішньомозкової та дисемінованої гліоми, порівняно з несекретуючими НСК, а також активно індукували протипухлинний імунітет [19–21].

У наших дослідженнях показано опосередковану пухлинопригнічувальну дію при внутрішньоочеревинному введенні супернатанта НПК, що, очевидно, зумовлено підвищенням ефективності цитотоксичної функції імункомпетентних клітин тварин з індукованою гліомою під впливом продукованих НПК факторів (цитокінів). Відомо, що НПК щура можуть експресувати та продукувати як прозапальні, так і супресорні цитокіни (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, фактор некрозу пухлин- α (TNF- α) [17,18], лейкеміє-інгібувальний фактор [16]). За нашими даними, СНК містив дві основні переважаючі фракції білків: 67 кДа – 55%; 46 кДа – 44% (результат електрофорезу у 1,5% ПААГ); до складу мінорної фракції білків (~1%), за даними імунферментного аналізу, входили мозковий нейротрофічний фактор – BDNF (115 пг/мл), TGF- β 1 (12 пг/мл), а також IL-1 β та IL-4 у дуже низьких кількостях.

(неопубліковані дані). Оскільки цей перелік включає цитокіни з різноспрямованою дією, можна припустити, що саме відповідний баланс вказаних біологічно активних речовин у складі СНК сприяє подовженню терміну виживаності тварин із гліомою. Зокрема, за посилення протипухлинної цитотоксичності лімфоцитів може відповідати IL-1 β (активує проліферацію лімфоцитів). Крім того, не можна виключати також безпосередній проапоптотичний вплив на клітини пухлини TGF- β 1. Ще однією молекулою, що спричиняє ефект СНК, може бути канцеростатичний фактор неонатального мозку (neonatal brain-derived carcinostatic factor – NBCF), описаний у 90-х роках [22], молекулярна маса якого (62 кДа) наближається до однієї з переважаючих фракцій білків СНК (67 кДа). Відомо, що NBCF інгібував ріст і синтез ДНК в злоякісних клітинах [22]. Механізм стимуляції цитотоксичної активності імункомпетентних клітин за умов впливу СНК потребує подальших досліджень.

Таким чином, внутрішньоочеревинне введення СНК підвищувало цитотоксичну функцію імункомпетентних клітин у щурів з гліомою та збільшувало їх середню тривалість життя і медіану виживаності порівняно з тваринами-пухлиноносіями без введення СНК. Режимы введення СНК трикратно з 5-ї по 10-ту добу після перевивання пухлини та за тиждень до її перевивання були найбільш ефективними.

Л.Д. Любич, Н.І. Лисяний

ВЛИЯНИЕ СУПЕРНАТАНТА ПРОГЕНИТОРНЫХ НЕЙРОКЛЕТОК НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ У КРЫС С ГЛИОМОЙ

Изучали действие супернатанта прогениторных нейроклеток (СНК) на цитотоксическую функцию лимфоцитов у крыс в условиях физиологической нормы и экспериментально смоделированного опухолевого процесса (глиома головного мозга, штамм 101.8). Исследования проведены у животных с перевитой глиомой без введения СНК и различными режимами его введения (трикратно с 5-х по 10-е сутки после перевивки глиомы, а также предварительно

за неделю и за месяц до перевивки). В группы сравнения вошли крысы без глиомы, которым трикратно вводили СНК, и интактные животные (контроль). СНК получали из суспензии нейрогенных прогениторных клеток (НПК) мозга крысы на 14-е сутки гестации и вводили внутривентриально (0,12 мг белка на животное). Цитотоксическую функцию лимфоцитов крыс экспериментальных групп изучали с помощью МТТ-колориметрического теста с аллогенными клетками глиомы. Введение СНК повышало цитотоксическую активность лимфоцитов *in vitro* по отношению к аллогенным опухолевым клеткам как у интактных животных (на 37–38%), так и у крыс с глиомой (на 11–22%). Под влиянием СНК увеличивалась средняя продолжительность жизни и медиана выживаемости животных-носителей опухоли (в среднем на 3–4 дня). Режимы введения СНК трикратно с 5-х по 10-е сут после перевивки глиомы и за неделю до перевивки были наиболее эффективны. Таким образом, установлен опосредованный опухолеингибирующий эффект при внутривентриальном введении СНК крысам с глиомой, что, очевидно, обусловлено повышением эффективности цитотоксической функции иммунокомпетентных клеток животных с перевитой опухолью под влиянием продуцированных НПК факторов.

Ключевые слова: цитотоксическая функция лимфоцитов; глиома 101.8; супернатант прогениторных нейроклеток.

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

L.D. Liubich, N.I. Lisyany

THE INFLUENCE OF PROGENITOR NEUROCELLS SUPERNATANT ON THE LYMPHOCYTES CYTOTOXIC FUNCTION IN RATS WITH GLIOMA

The impact of rat neurogenic progenitor cells supernatant (RPNS) on the cytotoxic function of lymphocytes in rats under conditions of physiological norm and experimentally modeled tumor (brain glioma strain 101.8) was studied. The research was carried out in animals with inoculated tumor without RPNS injection and with different regimes of RPNS injection (thrice repeated from 5th to 10th day after glioma inoculation as well as 1 week and 1 month before tumor inoculation). Comparison groups included rats without glioma who triple injected with RPNS; and intact animals (control). RPNS was received from suspension of neurogenic progenitor cells (NPC) of rat brain on 14th day of gestation and injected intraperitoneally (0,12 mg per animal). Cytotoxic function of lymphocytes of experimental rats was evaluated in MTT-colorimetric test with allogeneic glioma cells. RPNS administration increased the cytotoxic activity of lymphocytes *in vitro* tests with allogeneic tumor cells in intact animals (to 37–38%) as well as in rats with glioma (to 11–22%). Under the RPNS influence the life expectancy and median survival of tumor-bearing animals increased (an average of 3–4 days). RPNS input modes such

as triple injection from 5th to 10th day after glioma inoculation and 1 week before inoculation were the most effective. Thus, indirect tumor-inhibiting effect under intraperitoneal RPNS administration in rats with glioma is demonstrated, which is obviously due to increased efficiency of cytotoxic function of immune cells of animals with inoculated tumor under the influence of the factors produced by NPC.

Key words: lymphocytes cytotoxic function; glioma 101.8; progenitor neurocells supernatant.

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

REFERENCES

- Lisyany NI. Immunology and immunotherapy of malignant brain gliomas. Kiev: Interservice; 2011. [Russian].
- Ghosh A, Bhattacharya M, Sarkar P, Acharya S, Chaudhury S. T11 target structure exerts effector function by activating immune cells in CNS against glioma where cytokine modulation provide favorable microenvironment. *Indian J Exp Biol.* 2010; 48(9): 879-88.
- Learn CA, Fecci PE, Schmittling RJ, Xie W, Karikari I, Mitchell DA, Archer GE, Wei Z, Dressman H, Sampson JH. Profiling of CD4+, CD8+, and CD4+CD25+CD45RO+FoxP3+ T cells in patients with malignant glioma reveals differential expression of the immunologic transcriptome compared with T cells from healthy volunteers. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(24): 7306-15.
- Huang H, Hara A, Homma T, Yonekawa Y, Ohgaki H. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005; 64 (10): 891-901.
- Nano R, Capelli E, Facoetti A, Benericetti E. Immunobiological and experimental aspects of malignant astrocytoma. *Anticancer Res.* 2009; 29: 2461-6.
- Mehling M, Simon P, Mittelbronn M, Meyermann R, Ferrone S, Weller M, Wiendl H. WHO grade associated downregulation of MHC class I antigen-processing machinery components in human astrocytomas: does it reflect a potential immune escape mechanism? *Acta Neuropathol.* 2007; 114 (2): 111-9.
- Kren L, Muckova K, Lzicarova E, Sova M, Vybihal V, Svoboda T. Production of immune-modulatory nonclassical molecules HLA-G and HLA-E by tumor infiltrating ameboid microglia/macrophages in glioblastomas: a role in innate immunity? *J Neuroimmunol.* 2010; 220 (1-2): 131-5.
- Kren L, Slaby O, Muckova K, Lzicarova E, Sova M, Vybihal V, Svoboda T, Fadrus P, Lakomy R, Vanhara P. Expression of immune-modulatory molecules HLA-G and HLA-E by tumor cells in glioblastomas: an unexpected prognostic significance. *Neuropathology.* 2011; (2): 129-34.
- Achanta P, Sedora Roman NI, Quiñones-Hinojosa A. Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010; 10 (2): 121-30.
- Bovenberg MS, Degeling MH, Tannous BA. Advances in stem cell therapy against gliomas. *Trends Mol Med.* 2013; 19 (5): 281-91.
- Kim SU. Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors. *Stem Cell Rev.* 2011; 7(1): 130-40.
- Ahmed AU, Ulasov IV, Mercer RW, Lesniak MS. Maintaining and loading neural stem cells for delivery of oncolytic adenovirus to brain tumors. *Methods Mol Biol.* 2012; 797: 97-109.
- Stafin K, Lindvall M, Zuchner T, Lundberg C. Instructive cross-talk between neural progenitor cells and gliomas. *J Neurosci Res.* 2007; 85(10): 2147-59.
- Halanskij AS, Kondakova LI, Avcyn AP. New transplantable rat brain gliomas. *Voprosy neirohirurgii.* 1995; (2): 23-5. [Russian].
- Liubich LD, Lisyany NI, inventor; SI "Institute of neurosurgery n.acad.A.Romodanov NAMS of Ukraine", assignee. Method of study of allocytotoxic activity of immune cells. Ukraine patent UA 75059. 2012 Nov 11. [Ukrainian].
- Chen HC, Ma HI, Sytwu HK, Wang HW, Chen CC, Liu SC, Chen CH, Chen HK, Wang CH. Neural stem cells secrete factors that promote auditory cell proliferation via a leukemia inhibitory factor signaling pathway. *J Neurosci Res.* 2010; 88(15): 3308-18.
- Klassen HJ, Imfeld KL, Kirov II, Tai L, Gage FH, Young MJ, Berman MA. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. *Cytokine.* 2003; 22(3-4): 101-6.
- Liu J, Götherström C, Forsberg M, Samuelsson EB, Wu J, Calzarossa C, Hovatta O, Sundström E, Åkesson E. Human neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells and fetal nervous system present differences in immunogenicity and immunomodulatory potentials in vitro. *Stem Cell Res.* 2013; 10(3): 325-37.
- Ehtesham M, Kabos P, Kabosova A, Neuman T, Black KL, Yu JS. The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Res.* 2002; 62(20): 5657-63.
- Yang SY, Liu H, Zhang JN. Gene therapy of rat malignant gliomas using neural stem cells expressing IL-12. *DNA Cell Biol.* 2004; 23(6): 381-9.
- Yuan X, Hu J, Belladonna ML, Black KL, Yu JS. Interleukin-23-expressing bone-marrow-derived neural stem-like cells exhibit antitumor activity against intracranial glioma. *Cancer Res.* 2006; 66(5): 2630-8.
- Miwa N., Mizuno S., Suitani Y. Tumor growth-inhibitory glycoprotein secreted from the mouse brain at terminal stage of the ontogeny: molecular homogeneity and requirement of the retained protein conformation for exhibition of the cytotoxic action. *Biochim.Biophys. Acta.* 1990; 1034(3): 309-17.

Матеріал надійшов до редакції 10.12.2014