

Л.М. Бельська  
М.І. Лісяний

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

**Ключові слова:** гліома, ступінь злоякісності, периферична кров, ефектори протипухлинного імунітету, лімфоцити, фенотип.

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ ЕФЕКТОРНИХ КЛІТИН У ПЕРИФЕРИЧНІЙ КРОВІ ХВОРИХ З ГЛІОМАМИ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ

**Мета:** дослідити зміни субпопуляційного складу лімфоцитів периферичної крові хворих з гліомами різного ступеня злоякісності до оперативного втручання. **Об'єкт і методи:** матеріалом для дослідження слугувала периферична кров нейроонкологічних хворих (41 зразок) та умовно здорових осіб (9 зразків). Кількісний склад субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові визначали на проточному цитофлюориметрі «FC-500» («Beckman Coulter», США) з використанням подвійних комбінацій моноклональних антитіл («Beckman Coulter», США). Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel із визначенням середнього арифметичного і стандартного статистичного відхилення ( $m \pm \delta$ ) та *t*-критерію Стьюдента. **Результати:** для хворих із пухлинами головного мозку різного гістогенезу характерне зниження в периферичній крові вмісту основних ефektorів клітинної ланки імунітету — цитотоксичних лімфоцитів (ЦТЛ), натуральних кілерних клітин (НКК) та натуральних кілерних Т-клітин (НКТК). У хворих з доброякісним перебігом гліом (I–II ступінь анаплазії) визначали незначне зменшення кількості ЦТЛ, НКТК та НКК порівняно з відповідними показниками умовно здорових осіб. Злоякісний перебіг гліом (III–IV ступінь анаплазії) супроводжувався статистично достовірним ( $p < 0,05$ ) зменшенням вмісту клітин названих субпопуляцій порівняно з показниками не лише умовно здорових осіб, а й пацієнтів з гліомами I–II ступеня анаплазії, а також підвищенням вмісту лімфоцитів, які експресують маркер апоптозу (CD95<sup>+</sup>). **Висновок:** аналіз субпопуляційного складу лімфоцитів периферичної крові хворих із пухлинами головного мозку свідчить про розвиток виражених порушень у клітинній ланці протипухлинного імунітету (як вродженого, так і адаптивного) у пацієнтів зі злоякісним перебігом гліом (III–IV ступінь анаплазії).

Розвиток пухлин центральної нервової системи (ЦНС) асоціюється зі змінами в імунній системі, зокрема зі значною імуносупресією за рахунок лімфопенії, пригніченням проліферативної активності лімфоцитів, зниженням експресії антигенів головного комплексу гістосумісності I класу на моноцитах, переважанням протизапальних цитокінів Т-хелперів 2-го типу (Th2) тощо [1–3]. Протягом певного часу велика увага дослідників зосереджена на вивченні у пацієнтів із пухлинами ЦНС ефektorних клітин, зокрема цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ), натуральних кілерних клітин (НКК) та натуральних кілерних Т-клітин (НКТК), які відіграють провідну роль у протипухлинному імунітеті.

Потенціал НКК як ефektorів протипухлинного імунітету у хворих із пухлинами головного мозку був продемонстрований у дослідженнях *in vitro* [4] та *in vivo* [5–7]. Цитотоксичний вплив НКК на пухлинні клітини реалізується декількома шляхами, основним з яких є перфорин-гранзимовий. З ін-

шого боку, НКК конститутивно експресують на поверхні CD95-ліганд і TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor), які зв'язуються з рецепторами на клітинах-мішенях та індуюють процес апоптозу. НКК можуть взаємодіяти з Fc-фрагментом антитілу через рецептор Fc $\gamma$ RIII (CD16) та брати участь в антитілозалежному кілінгу клітин-мішеней [8]. Крім того, НКК секретують цитокіни (наприклад інтерферон (IFN)- $\gamma$ ) і хемокіни, які мають імуномодуючі ефекти, такі як праймування клітинних реакцій Т-хелперів 1-го типу (Th1) і класична поляризація макрофагів M1.

При різних типах онкологічних захворювань зменшення кількості та зниження активності НКК може слугувати прогностичним критерієм метастазування, зниження відповіді на лікування, загальної виживаності хворих онкологічного профілю [9–11]. Внутрішньовенне або внутрішньочерепне введення необроблених аутологічних НКК у хворих із рецидивуючою злоякісною гліомою зумовлювало у 45% пацієнтів регрес пухлини [12].

Інша популяція ефекторних клітин імунної системи — НКТК. Ці клітини експресують маркери НКК (CD16, CD56, CD161), Т-клітинні диференціювальні антигени (CD3, CD4, CD8), Т-клітинний рецептор (TCR $\alpha\beta$ ). Залежно від типу НКТК секретують цитокіни Т-хелперів (Th1 або Th2) і беруть участь у про- або протипухлинній імунній відповіді. НКТК I типу можуть стимулювати протипухлинну імунну відповідь за рахунок швидкої секреції IFN- $\gamma$  та відігравати роль стимуляторів активності інших клітин. Продукований цими клітинами IFN- $\gamma$ , з одного боку, стимулює дозрівання дендритних клітин, з другого — активізує макрофаги та CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцити. Зрілі дендритні клітини продукують інтерлейкін (IL)-12, що стимулює подальшу продукцію IFN- $\gamma$  та IL-2 НКТК I типу; в свою чергу дані цитокіни активують НКК, CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцити та макрофаги M1. Активовані лімфоцити викликають лізис пухлинних клітин за рахунок різних механізмів, у тому числі продукції перфोरину, гранзимів, окису азоту та FasL [13]. Описано, що активація НКТК I типу за допомогою гліколіпиду  $\alpha$ -GalCer ( $\alpha$ -Galactosylceramide) призводить до активації НКК і Т-клітин, індукує виражену протипухлинну імунну відповідь як щодо трансплантованих і хімічно індукованих, так і спонтанних пухлин [14]. На різних експериментальних моделях пухлинного росту продемонстрована антиметастатична активність НКТК I типу, активованих  $\alpha$ -GalCer [15, 16]. У хворих із солідними пухлинами встановлено зниження НКТК I типу в периферичній крові [14].

НКТК II типу виявляють супресорний вплив на НКТК I типу та CD8<sup>+</sup> пухлиноспецифічні Т-лімфоцити, що пов'язано з підвищенням рівня IL-13 і трансформуючого фактора росту бета (TGFB) та кількості CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> міелоїдних супресорних клітин [15, 16]. Супресорна активність НКТК II типу продемонстрована в дослідженнях з використанням різних експериментальних моделей пухлин [17, 18].

Іншими ефекторами адаптивного імунітету, що чинять цитотоксичну дію щодо пухлинних клітин, є ЦТЛ CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, які реалізують свої функції при взаємодії з пухлиноспецифічними антигенами, експресованими на цитоплазматичній мембрані злаякісних клітин сумісно з молекулами головного комплексу гістосумісності («подвійне розпізнавання») [19]. Цитотоксичний вплив на пухлинні клітини вони здійснюють шляхом класичного перфорин-гранзимового механізму контактного цитолізу, індукують Fas-залежний апоптоз пухлинних клітин. У дослідженнях показано, що фактори, які секретуються активованими ЦТЛ, викликають апоптоз клітин перевивних ліній гліобластом [20]. Введення алореактивних ЦТЛ та IL-2 хворим із рецидивуючою злаякісною гліомою збільшує тривалість безрецидивного періоду захворювання до 28–30 міс [21]. Зміни в кількісному і субпопуляційному складі ЦТЛ виявлено при широкому спектрі онко-

логічних захворювань. Зниження вмісту CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клітин і синтез цієї субпопуляцією перфोरину в периферичній крові корелює з поганим прогнозом у хворих на рак легені [22]. Низька щільність інфільтрації CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитами первинної пухлини раку шлунка асоціюється з несприятливим прогнозом [23].

Проте, незважаючи на досить тривале вивчення ролі різних субпопуляцій ефекторних імунних клітин в експериментальних дослідженнях та у пацієнтів з різною онкопатологією, вміст НКК, НКТК та ЦТЛ у хворих з гліомами різного ступеня злаякісності досліджено недостатньо.

Мета роботи — дослідити вміст НКК, НКТК та ЦТЛ у периферичній крові хворих з гліомами різного ступеня злаякісності до оперативного втручання.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом для дослідження слугувала периферична кров нейроонкологічних хворих (41 зразок) та умовно здорових осіб (9 зразків). Гістологічну діагностику пухлин на біопсійному матеріалі здійснювали у відділі нейропатоморфології ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» згідно з останньою Міжнародною класифікацією ВООЗ пухлин ЦНС (2016). Кількість пацієнтів із пухлинами ЦНС: атипічні менінгіоми — 5, аденоми гіпофізу — 3; гліоми різного ступеня злаякісності: фібрилярно-протоплазматичні — 4 (I–II ступінь), анапластичні астроцити — 11 та анапластичні олігодендрогліоми — 6 (III ступінь), гліобластоми — 12 (IV ступінь). Периферичну кров нейроонкологічних хворих отримано до проведення оперативного втручання. Усі пацієнти були поінформовані про проведення обстеження і дали письмову згоду на використання їхнього біологічного матеріалу в наукових цілях.

Кількісний склад субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові визначали на проточному цитофлуориметрі «FC-500» («Beckman Coulter», США) за програмою Cytomics CXP Software з використанням подвійних комбінацій моноклональних антитіл («Beckman Coulter», США). Оцінювали такі показники, як: загальна кількість Т-лімфоцитів (CD3<sup>+</sup>), кількість клітин з маркерами CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, ЦТЛ (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), НКТК (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), НКК (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), а також вміст лімфоцитів, які несуть маркерний антиген апоптозу (CD95<sup>+</sup>). Постановку реакції кількісного визначення субпопуляцій лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл проводили згідно з інструкціями виробників антитіл і медичними рекомендаціями для роботи з цільною кров'ю [24].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel із визначенням середнього арифметичного і стандартного статистичного відхилення ( $m \pm \delta$ ) та t-критерію Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У хворих із пухлинами ЦНС різного ступеня злоякісності до оперативного втручання визначали певні зміни кількості лейкоцитів, а також відмінності в кількісному та фенотиповому складі лімфоцитів. Відмічали збільшення загальної кількості лейкоцитів (в 1,4 раза) та статистично вірогідне зменшення відносного вмісту лімфоцитів ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Таблиця 1  
Субпопуляційний склад лімфоцитів периферичної крові хворих із пухлинами ЦНС

Показники	Хворі з пухлинами ЦНС (n = 41)	Умовно здорові особи (n = 9)
Лейкоцити, $\cdot 10^9/\text{л}$	$7,82 \pm 2,95$	$5,71 \pm 0,52$
Лімфоцити, %	$19,45 \pm 11,02^1$	$33,76 \pm 2,04$
Лімфоцити, $\cdot 10^9/\text{л}$	$2,08 \pm 0,70$	$1,92 \pm 0,18$
Субпопуляційний склад лімфоцитів		
CD3 <sup>+</sup> , %	$66,73 \pm 9,10$	$65,78 \pm 1,63$
CD3 <sup>+</sup> , $\cdot 10^9/\text{л}$	$1,34 \pm 0,53$	$1,23 \pm 0,11$
CD4 <sup>+</sup> , %	$41,88 \pm 8,94$	$36,27 \pm 0,24$
CD4 <sup>+</sup> , $\cdot 10^9/\text{л}$	$0,87 \pm 0,34$	$0,65 \pm 0,05$
CD8 <sup>+</sup> , %	$24,84 \pm 5,64$	$30,51 \pm 0,41$
CD8 <sup>+</sup> , $\cdot 10^9/\text{л}$	$0,51 \pm 0,18$	$0,57 \pm 0,03$
CD4/CD8	$1,80 \pm 0,66$	$1,21 \pm 0,09$
CD16 <sup>+</sup> , %	$15,56 \pm 1,25^1$	$20,30 \pm 1,43$
CD16 <sup>+</sup> , $\cdot 10^9/\text{л}$	$0,29 \pm 0,03^1$	$0,38 \pm 0,03$
ЦТЛ (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), %	$19,18 \pm 6,05$	$25,30 \pm 0,42$
ЦТЛ (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), $\cdot 10^9/\text{л}$	$0,39 \pm 0,17$	$0,49 \pm 0,06$
НКТК (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ), %	$6,37 \pm 3,70$	$9,85 \pm 0,77$
НКТК (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ), $\cdot 10^9/\text{л}$	$0,11 \pm 0,01^1$	$0,18 \pm 0,03$
НКК (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ), %	$13,26 \pm 6,92$	$17,20 \pm 1,43$
НКК (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ), $\cdot 10^9/\text{л}$	$0,25 \pm 0,16$	$0,33 \pm 0,02$

<sup>1</sup>Вірогідність зміни показника  $p < 0,05$  порівняно з контролем.

При аналізі показників субпопуляційного складу лімфоцитів відмічене незначне зменшення відносної та абсолютної кількості CD8<sup>+</sup> клітин при збільшенні кількості клітин з маркером CD4<sup>+</sup>. Поряд з цим у обстежених хворих відзначали зниження в 1,3 раза відносної та абсолютної кількості ЦТЛ (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) (див. табл. 1). При цьому у 22% пацієнтів (9 з 41) кількість CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клітин була зменшена в 2,5 раза.

Показано статистично вірогідне ( $p < 0,05$ ) зниження відносної кількості клітин з фенотипом CD16<sup>+</sup>. У 19 з 41 нейроонкологічного хворого кількість CD16<sup>+</sup> клітин зменшувалася в 3 рази. Також встановлено зменшення як відносної, так і абсолютної кількості НКТК (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) (в 1,5 і 1,6 раза відповідно) та НКК (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) (у середньому на 35%). Аналіз індивідуальних даних пацієнтів із пухлинами ЦНС виявив, що відносна кількість НКК зменшена у 32% хворих у 2 рази, а у 15% хворих — у 3 рази. При цьому у 39% таких пацієнтів у периферичній крові поряд зі зниженням вмісту НКК відмічали також зменшення відносної (в 2,5 раза) і абсолютної (в 3 рази) кількості НКТК, що свідчить про значне пригнічення ефекторної ланки протипухлинного імунітету у хворих із пухлинами ЦНС.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що у пацієнтів із пухлинами головного мозку розвивається дисбаланс в складі основних субпопуляцій

клітин периферичної крові, а саме: зниження рівня CD8<sup>+</sup> та підвищення рівня CD4<sup>+</sup> лімфоцитів, що призводить до зростання в 1,5 раза відносного показника CD4/CD8. Поряд із незначним зниженням рівня CD8<sup>+</sup> Т-клітин відбувалося вірогідне зменшення кількості НКТК, рівень НКК у периферичній крові пацієнтів із пухлинами знижувався недостовірно. Отже, у хворих із пухлинами головного мозку спостерігали суттєве ( $p < 0,05$ ) зменшення кількості клітин-ефекторів природного імунітету (НКТК і CD16<sup>+</sup>) та незначне зниження рівня CD8<sup>+</sup> лімфоцитів на фоні субкомпенсаторного збільшення кількості CD4<sup>+</sup> клітин, що може свідчити, на думку авторів, не про загальне гальмування генерації лімфоцитів, а тільки певних їх субпопуляцій, які відповідають за протипухлинний імунітет.

Порівняльне дослідження вмісту різних субпопуляцій ефекторних клітин у периферичній крові хворих з гліомами різного ступеня злоякісності виявило певні особливості. Дані, наведені в табл. 2, свідчать про вірогідне ( $p < 0,05$ ) зменшення відносного вмісту ЦТЛ (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), НКТК (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) та НКК (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) у периферичній крові хворих зі злоякісним перебігом гліом (ступінь злоякісності III–IV) порівняно як з контрольними показниками умовно здорових донорів, так і з відповідними показниками хворих із доброякісним перебігом гліом (ступінь злоякісності II). Так, у хворих з гліомами II ступеня злоякісності в периферичній крові визначали несуттєве зменшення кількості НКТК, НКК та ЦТЛ порівняно з відповідними показниками умовно здорових осіб. Зіставлення відносного вмісту ефекторних клітин різних субпопуляцій в периферичній крові у хворих з гліомами III та IV ступеня злоякісності не виявило суттєвих відмінностей між цими групами. Проте показано, що для пацієнтів зі злоякісним перебігом гліом характерне більш виражене зменшення кількості клітин порівняно як з відповідними показниками умовно здорових осіб, так і з показниками хворих із доброякісним перебігом захворювання. Зокрема, кількість НКК була зменшеною в 1,5 раза порівняно з показниками пацієнтів з гліомами II ступеня та в 2 рази порівняно з показниками контрольної групи. Відносний вміст ефекторних Т-клітин (НКТК та ЦТЛ) зменшувався на 25–30% порівняно з відповідними показниками хворих з гліомами II ступеня та в середньому на 50% — порівняно з показниками умовно здорових осіб.

Таким чином, у пацієнтів зі злоякісними гліомами III та IV ступеня анаплазії відмічається більш значне зменшення кількості цитотоксичних лімфоцитів (ЦТЛ, НКК, НКТК) порівняно з пацієнтами з пухлинами I–II ступеня анаплазії. Судячи із середнього групового рівня клітин цих субпопуляцій в периферичній крові, складно визначити, на яку популяцію більшою мірою діють імуносупресивні чинники пухлини. Водночас можна припустити, що таке гальмування продукції цитотоксичних лімфоцитів

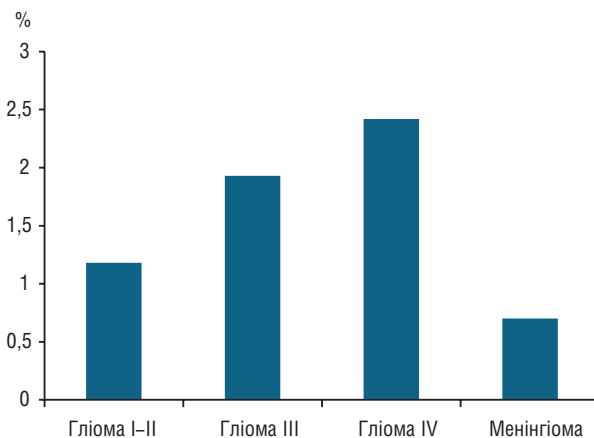
Субпопуляційний склад лімфоцитів периферичної крові хворих з пухлинами ЦНС різного ступеня злоякісності

Показники	Ступінь злоякісності гліом			Контроль (n = 9)
	I–II (n = 4)	III (n = 17)	IV (n = 12)	
Лейкоцити, $\cdot 10^9/\text{л}$	7,50 $\pm$ 1,54	7,98 $\pm$ 1,79	8,91 $\pm$ 0 3,32	5,71 $\pm$ 0,52
Лімфоцити, $\cdot 10^9/\text{л}$	33,50 $\pm$ 3,70	27,80 $\pm$ 11,30	18,60 $\pm$ 4,80	33,76 $\pm$ 2,04
Субпопуляційний склад лімфоцитів, %				
CD3 <sup>+</sup>	66,00 $\pm$ 2,90	63,70 $\pm$ 7,43	58,70 $\pm$ 6,29	65,78 $\pm$ 1,63
CD4 <sup>+</sup>	36,01 $\pm$ 3,15	38,70 $\pm$ 5,42	35,90 $\pm$ 4,26	36,27 $\pm$ 0,24
CD8 <sup>+</sup>	30,50 $\pm$ 3,71	23,68 $\pm$ 4,88	21,66 $\pm$ 6,67 <sup>1</sup>	30,51 $\pm$ 0,41
CD4/CD8	1,20 $\pm$ 0,08	1,65 $\pm$ 0,09	1,66 $\pm$ 0,27	1,21 $\pm$ 0,09
CD16 <sup>+</sup>	18,70 $\pm$ 2,44	15,98 $\pm$ 7,26	15,45 $\pm$ 7,07	20,30 $\pm$ 1,43
ЦТЛ (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	22,30 $\pm$ 2,51	17,20 $\pm$ 6,80 <sup>1,2</sup>	17,00 $\pm$ 2,53 <sup>1,2</sup>	25,30 $\pm$ 0,42
НКТК (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> )	7,40 $\pm$ 2,00	5,92 $\pm$ 2,95 <sup>1</sup>	5,71 $\pm$ 1,84 <sup>1</sup>	9,85 $\pm$ 0,77
НКК (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> )	13,80 $\pm$ 1,48	8,44 $\pm$ 4,17 <sup>2</sup>	9,05 $\pm$ 2,18 <sup>1,2</sup>	17,20 $\pm$ 1,43

<sup>1</sup>Вірогідність зміни показника  $p < 0,05$  відносно контролю; <sup>2</sup>вірогідність зміни показника  $p < 0,05$  відносно групи хворих із доброякісним перебігом гліом.

різних субпопуляцій відбувається на різних рівнях лімфопоезу або на різних етапах їх диференціювання в цитотоксичні клітини.

Виявлений нами дисбаланс ефektorних клітин (а саме ЦТЛ, НКК і НКТК), значне зменшення яких визначалося у хворих зі злоякісними гліомами, може мати декілька механізмів. Одним із них є Fas-опосередкована делеція, зумовлена наявністю циркулюючих розчинних форм Fas-лігандів (FasL). Останні утворюються внаслідок відщеплення матриксними металопротеазами від поверхні пухлинної клітини трансмембранних форм FasL, і, таким чином, FasL<sup>+</sup> пухлини можуть індукувати апоптоз Fas<sup>+</sup> ЦТЛ. Підтвердженням такого припущення, на нашу думку, може бути виявлене нами підвищення ( $p < 0,05$ ) експресії маркера апоптозу CD95<sup>+</sup> у хворих з гліомами IV ступеня злоякісності: в 2 рази порівняно з показником пацієнтів з гліомами II ступеня та в 3,5 рази порівняно з пацієнтами з менінгіомами (рисунок). В літературі наведено відомості щодо експресії FasL на клітинах гліом [25].



**Рисунок.** Відносний вміст CD95<sup>+</sup> лімфоцитів у периферичній крові хворих із пухлинами ЦНС різного ступеню злоякісності

По-друге, не можна виключити пригнічувальний вплив на НКТК та ЦТЛ регуляторних Т-лімфоцитів (Treg), кількість яких збільшена

у хворих з гліомами, особливо зі злоякісним перебігом [26]. В експериментальних дослідженнях на різних моделях індукovanого пухлинного росту показано, що ін'єкції Treg призводять до зменшення кількості НКТК I типу та CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитів [27]. Супресорний ефект опосередковано секрецією фактора TGFβ. TGFβ індукуює Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), які перешкоджають проліферації CD8<sup>+</sup> клітин у відповідь на алоантиген та диференціюванню їх в ЦТЛ [28]. Відомо, що самі гліальні клітини здатні продукувати TGFβ, при цьому клітини злоякісних гліом продукують вірогідно більше TGFβ порівняно з клітинами доброякісних пухлин [29]. На нашу думку, це може зумовлювати більш виражені зміни вмісту ефektorних клітин (НКТК та ЦТЛ) у периферичній крові хворих з гліомами III та IV ступеня анаплазії.

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що у хворих з гліомами різного ступеня анаплазії до оперативного втручання визначається нерівномірне зниження в периферичній крові вмісту клітин-ефektorів протипухлинного імунітету, а саме: НКК, НКТК та ЦТЛ. Для гліальних пухлин I–II ступеня анаплазії (доброякісний перебіг) було характерним вірогідне зниження рівня НКК, з боку інших субпопуляцій лімфоцитів відмічали лише незначне відхилення від показників умовно здорових осіб. Злоякісний перебіг гліом супроводжувався більш значним ( $p < 0,05$ ) зменшенням вмісту клітин даних субпопуляцій в периферичній крові, що свідчить про суттєві порушення в протипухлинній ланці як вродженого, так і адаптивного імунітету у хворих із гліомами III та IV ступеня анаплазії.

## ВИСНОВКИ

1. У периферичній крові хворих з пухлинами головного мозку різного гістогенезу відмічали зменшення вмісту основних ефektorів клітинної ланки імунітету — ЦТЛ, НКК та НКТК.

2. Для хворих із доброякісним перебігом гліом (II ступінь) характерне несуттєве зменшення кількості

кості ЦТЛ, НКТК та НКК порівняно з відповідними показниками умовно здорових осіб.

3. Злоякісний перебіг гліом (III–IV ступінь) супроводжувався статистично достовірним ( $p < 0,05$ ) зниженням вмісту клітин названих субпопуляцій порівняно з показниками не лише умовно здорових осіб, а й пацієнтів з гліомами I–II ступеня анаплазії, а також підвищенням вмісту лімфоцитів, які експресують маркер апоптозу (CD95<sup>+</sup>).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Dix A, Brooks W, Roszman T, *et al.* Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumours. *J Neuroimmunol* 1999; **100** (2): 216–22.
- Parney I. Basic concepts in glioma immunology. In: *Yamanaka R* (ed). *Glioma*. Springer, New York, 2012: 42–52.
- Lisyany NI. Changes in immune responses in various species of gliomas. In: *Gliomas of the Brain. Zozylia UA* (ed). K., UIPK «EksOb», 2007. 235–53 (in Ukrainian).
- Avril T, Vauleon E, Hamlat A, *et al.* Human glioblastoma stem-like cells are more sensitive to allogeneic NK and T cell mediated killing compared with serum-cultured glioblastoma cells. *Brain Pathol* 2012; **22** (4): 159–74.
- Friese M, Wischhusen J, Wick W, *et al.* RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity *in vivo*. *J Neurooncol* 2014; **116** (1): 7121–3.
- Alizadeh D, Zhang L, Brown C, *et al.* Induction of anti-glioma natural killer cell response following multiple low-dose intracerebral CpG therapy. *Clin Cancer Res* 2010; **16** (2): 3399–408.
- Polli A, Wang J, Domingues O, *et al.* Targeting glioblastoma with NK cells and mAb against NG2/CSPG4 prolongs animal survival. *Oncotarget* 2013; **4** (9): 1507–26.
- Seidel U, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumour immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol* 2013; **4**: 76.
- Hsia J, Chen J, Chen C, *et al.* Prognostic significance of intratumoural natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Chang Gung Med J* 2005; **28** (5): 335–40.
- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, *et al.* Prognostic value of intratumoural natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000; **88** (3): 577–83.
- Kondo E, Koda K, Takiguchi N, *et al.* Preoperative natural killer cell activity as a prognostic factor for distant metastasis following surgery for colon cancer. *Dig Surg* 2003; **20** (5): 445–51.
- Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K, *et al.* Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res* 2004; **24** (3b): 1861–71.
- Akinfiyeva OV, Bubnov LN, Bessmelshev SS. NKT cells: characteristic features and functional significance in the immune response regulation. *Onkogematologiya* 2010; **4**: 39–43 (in Russian).
- Terabe M, Berzofsky JA, *et al.* The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* 2009; **101**: 277–348.
- Kato S, Berzofsky J, Terabe M, *et al.* Possible therapeutic application of targeting type II natural killer T cell-mediated suppression of tumor immunity. *Front Immunol* 2018; **22** (9): 314.
- Robertson F, Berzofsky J, Terabe M, *et al.* NKT cell networks in the regulation of tumor immunity. *Front Immunol* 2014; **5**: 543.
- Ambrosino E, Terabe M, Halder R. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *J Immunol* 2007; **179** (8): 5126–36.

18. Hix L, Shi Y, Brutkiewicz R, *et al.* CD1d-expressing breast cancer cells modulate NKT cell-mediated antitumor immunity in a murine model of breast cancer metastasis. *PLoS One* 2011; **6** (6): 20702.

19. Liao Y, Geng P, Tian Y, *et al.* Marked anti-tumor effects of CD8(+)/CD62L(+) T-cells from melanoma-bearing mice. *Immunol Invest* 2015; **44** (2): 147–63.

20. Cagigi A, Nilsson A, Levitsky V, Sabri F. Cytotoxic T-lymphocytes secrete soluble factors that induce caspase-mediated apoptosis in glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 2010; **225** (1–2): 34–42.

21. Kruse C, Cepeda L, Owens B, *et al.* Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 1997; **45** (2): 77–87.

22. Xu L, Chen D, Lu C, *et al.* Advanced lung cancer is associated with decreased expression of perforin, CD95, CD38 by circulating CD3+CD8+ T lymphocytes. *Ann Clin Lab Sci* 2015; **45** (5): 528–32.

23. Tuncel T, Karagoz B, Haholu A, *et al.* Immunoregulatory function of HLA-G in gastric cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2013; **14** (12): 7681–4.

24. Parks DR, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting: theory, experimental optimization, and applications in lymphoid cell biology. *Methods Enzymol* 1984; **108**: 197–241.

25. Saggiaro F, Neder L, Stávale J, *et al.* Fas, FasL, and cleaved caspases 8 and 3 in glioblastomas: a tissue microarray-based study. *Pathol Res Pract* 2014; **210** (5): 267–73.

26. Belskaya LN, Lisyany NI. Number CD4+CD25+ immunoregulatory cells at patients with glioma tumor. *Immunol Allergol. Science Prakt* 2011; **4**: 50–3 (in Ukrainian).

27. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, *et al.* Human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell function. *Cancer Res* 2003; **63**: 4516–20.

28. Freidlin IS. Regulatory T-cells: nature and functions. *Med Immunol* 2005; **7** (4): 347–54 (in Russian).

29. Lisyany NI, Belska LN. Immunosuppressive influence of the malignant brain tumors. *Ukr Neurosurgical J* 2007; (1): 4–9 (in Ukrainian).

## INVESTIGATION OF THE CONTENT OF EFFECTOR CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH GLIOMAS OF DIFFERENT DEGREES OF MALIGNANCY

L.M. Belska, N.I. Lisyany

State Institution «Romodanov Neurosurgery Institute, National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

**Summary. Aim:** to investigate the changes in the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in patients with gliomas of varying degrees of malignancy before surgery. **Object and Methods:** samples the peripheral blood of neuroncological patients (41 samples) and conditionally healthy persons (9 samples) were examined. Quantitative composition of subpopulations of lymphocytes was studied on a flow cytometer «FC-500» («Beckman Coulter», USA) using dual monoclonal antibody combinations («Beckman Coulter», USA). Statistical processing of the results was carried out with the help of the Microsoft Excel program with the determination of the mean arithmetic and standard statistical deviation ( $m \pm \delta$ ) and Student's *t*-criterion. **Results:** contents of the main effector cells of the immune system — cytotoxic lymphocytes (CTL), natural killer cells (NKCs)

and natural killer T cells (NSCTs) was found in peripheral blood of patients with brain tumors of different histogenesis. In patients with gliomas I–II degree of anaplasia, a slight decrease in the number of CTL, NSCLC and NSC was determined in comparison with the corresponding indices of conditionally healthy persons. Malignant gliomas (III–IV degree of anaplasia) was accompanied by a statistically significant ( $p < 0.05$ ) decrease in the content of cells of these subpopulations compared with those of not only conditionally healthy persons, but also patients with gliomas of the I–II degree of anaplasia, as well as an increase in the content of lymphocytes, expressing an apoptosis marker (CD95<sup>+</sup>). **Conclusion:** the analysis of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in patients with brain tumors suggests

the development of marked violations in cellular antitumor immunity (both congenital and adaptive) in patients with malignant flow of gliomas (III–IV degree of anaplasia).

**Key Words:** gliomas, degree of malignancy, peripheral blood, effector immune cells, lymphocytes, phenotype.

**Адреса для листування:**

Бельська Л.М.  
04050, Київ, вул. Платона Майбороди, 32  
ДУ «Інститут нейрохірургії  
ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»  
E-mail: adsg@ukr.net

Одержано: 18.06.2018