*УДК 611-013.7/.8-018.8:616.831-006.484:616.155-092.9.259*

М.І. Лісяний, Л.М. Бєльська*, В.М.Семенова, В.Д. Розуменко, Л.П. Стайно

# Дослідження впливу пептидів ембріональної нервової тканини щурів на клітини внутрішньомозкових пухлин та функціональну активність мононуклеарів периферичної крові

*UDC 611-013.7/.8-018.8:616.831-006.484:616.155-092.9.259*

M.I. Lisyanyy, L.M. Belska*, V.M. Semenova, V.D. Rozumenko, L.P. Stajno

# Study of Effect of Rat Embryonic Neural Tissue Peptides on Intracerebral Tumor Cells and Functional Activity of Peripheral Blood Mononuclears

Досліджували вплив пептидів ембріонального мозку (ПЕМ) щурів (Е17) на життєздатність клітин експериментальної гліоми 101.8, внутрішньомозкових пухлин людини та функціональну активність мононуклеарів периферичної крові. Виявили, що ПЕМ щура мають пряму цитотоксичну дію на клітини пухлин та нормалізують показники спонтанної та стимульованої продукції супероксидного радикала мононуклеарів периферичної крові нейроонкологічних хворих. Рівень даного впливу має дозозалежний характер.

***Ключові слова:*** пептиди ембріонального мозку, гліома, мононуклеари периферичної крові.

Исследовали влияние пептидов эмбрионального мозга (ПЭМ) крыс (Е17) на жизнеспособность клеток экспериментальной глиомы 101.8, внутримозговых опухолей человека и функциональную активность мононуклеаров периферической крови. Выявили, что ПЭМ крыс оказывают прямое цитотоксическое действие на клетки опухолей и нормализуют показатели спонтанной и стимулированной продукции супероксидного радикала мононуклеаров периферической крови нейроонкологических больных. Уровень данного влияния имеет дозозависимый характер.

***Ключевые слова:*** пептиды эмбрионального мозга, глиома, мононуклеары периферической крови.

The effect of embryonic brain peptides (EBP) of rats (E17) on viability of experimental cells of 101.8 strain glioma, human intracerebral tumors and functional activity of mononuclears of peripheral blood was studied. There was revealed that EBP of rats rendered a direct cytotoxic effect on cells of tumors and normalized the indices of spontaneous and stimulated production of superoxide radical of mononuclears of peripheral blood of neurooncological patients. The rate of this effect is of dose-dependent character.

***Key-words:*** peptides of embryonic brain, glioma, peripheral blood mononuclears.

Нейроонкологічні захворювання – важлива невирішена медико-соціальна проблема, пов'язана з прогресуванням пухлин ЦНС, особливо найбільш злоякісних форм, та незадовільними результатами їх лікування традиційними методами хірургічного втручання і хіміо- та променевої терапії [9, 13].

Останнім часом одним із перспективних підходів до підвищення ефективності комбінованого лікування нейроонкологічних хворих вважається терапія фетальними тканинами, окремими клітинними популяціями та біологічними чинниками цих тканин [18, 20].

В експерименті встановлена протипухлинна активність клітин ембріональної та постнатальної нервової тканини відносно гліом, трансплантованих під капсулу нирки мишей [11]. Виражена цитотоксична активність клітин ембріональної нервової тканини щурів виявлена також по відношенню до експериментальної гліоми 101.8 на моделі їх сумісного культивування [14]. Показана можливість використання нейральних стовбурових клітин як терапевтично ефективного засобу при лікуванні гліоми С6 та N29 [18, 20].

На сучасному етапі вивчається можливість використання клітин фетоплацентарного комплексу як терапевтичного лікувального засобу при онкопатології та тканинних регуляторних пептидів, які виявляють протипухлинні (в тестах *in vitro* та *in vivo*

ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. Ромоданова АМН України", м. Київ

* *Автор, якому необхідно направляти кореспонденцію:* вул. Мануїльського, 32, м. Київ, Україна 04050; тел.: +38 (044) 483-81-93, електронна пошта: adsg@ukr.net

Institute of Neurosurgery named after Acad. A.P. Romodanov of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

* *To whom correspondence should be addressed:* 32, Manuilskogo str., Kiev, Ukraine 04050; tel.: +380 44 4838193, e-mail: adsg@ukr.net

[1, 2, 5, 17]) та імуномодулюючі властивості, що важливо у зв'язку з наявністю порушень в ланці протипухлинного імунітету у нейроонкологічних хворих [10, 12 ].

Мета роботи – дослідження впливу пептидів ембріонального мозку (ПЕМ) щурів (Е17) на життєдіяльність клітин внутрішньомозкових пухлин в короткострокових суспензійних та довгострокових первинних культурах і на функціональну активність мононуклеарів периферичної крові донорів та нейронкологічних хворих *in vitro*.

## Матеріали та методи

Матеріалом дослідження були біоптати (25 зразків) внутрішньомозкових пухлин різного ґенезу, отримані у хворих під час нейрохірургічних операцій; клітини експериментальної перевивної гліоми (штам 101.8); гепаринізована кров здорових донорів та нейроонкологічних хворих. Гістологічна діагностика пухлин головного мозку проводилась відповідно до міжнародної гістологічної класифікації пухлин ЦНС.

Мононуклеари виділяли за загальноприйнятими методиками [15 ].

Пухлинну тканину із біопсійного матеріалу забирали під час оперативного втручання в середовище Ігла. Фрагменти пухлини дисоціювали та збагачували життєздатними клітинами за методикою [19]. Життєздатність клітин оцінювали в стандартному тесті за допомогою вітального фарбування розчином 0,2% трипанового синього [4].

Пептиди ембріонального мозку щурів отримували за оригинальною методикою шляхом обробки тканини головного мозку хімічними розчинами з наступним діалізом та висушуванням надосадової рідини [17], стандартизували за вмістом білка.

Визначення впливу ПЕМ на пухлинні клітини *in vitro* оцінювали в тесті з 0,1% розчином трипанового синього та в МТТ-тесті [16] після короткострокового культивування в повному поживному середовищі протягом 24 год без додавання ПЕМ (контроль) і присутності в культуральному середовищі ПЕМ (дослід) в концентраціях 100 та 10 мкг. Ефективність дії ПЕМ на клітини суспензійних культур визначали за цитотоксичним індексом (ЦІ) [16].

Дисоційовані фрагменти пухлин головного мозку вирощували у чашках Петрі на покривних скельцях із адгезивним субстратом у повному поживному середовищі №199 та ДМЕМ. Культури утримувались в $CO_2$-інкубаторі при постійних температурі, вологості та вмісті $CO_2$. За культурами прижиттєво щоденно спостерігали в інвертованому мікроскопі. Після отримання поширеної зони росту (10–12 доба) до культур додавали ПЕМ (дослід) в концентраціях 100 та 10 мкг. Після інкубації культур з ПЕМ на протязі 24 год для гістологічного дослідження контрольні і дослідні культури фіксували в 10%-му формаліні і фарбували гематоксиліном Караччі [4 ].

Цитотоксичний вплив *in vitro* ПЕМ на клітини гліоми штам 101.8 (M+m; n=8)

| Концентрація ПЕМ | Показники | | |
|---|---|---|---|
| | Кількість клітин, $10^6$/мл | Відсоток життєздатності* | Цитотоксичний індекс# |
| 10 мкг | 1,75±0,15 | 54,56±10,35 | 10,90±4,30 |
| 100 мкг | 1,55±0,20 | 37,51±9,20& | 43,30±10,8 |
| Контроль | 2,0±0,0 | 65,40±14,25 | – |

**Примітка:** * – за показниками вітального фарбування трипановим синім; # – за показниками МТТ-тесту; & – вірогідність різниці показника відносно контролю (p<0,01).

Фагоцитарну активність мононуклеарів (спонтанну і стимульовану) вивчали в НСТ-тесті [7], після культивування клітин у повному поживному середовищі протягом 24 год без додавання ПЕМ (контроль) і в присутності в культуральному середовищі ПЕМ (дослід) у концентраціях 100 та 10 мкг.

Математична обробка отриманих результатів проводилася з використанням пакета програм "Statistica 5,0".

## Результати та обговорення

Дослідження впливу ПЕМ щурів (Е17) на клітини перевивної експериментальної гліоми 101.8 в тестах *in vitro* показало, що початкова концентрація ПЕМ 10 мкг суттєво не впливала на їх життєздатність. Збільшення концентрації ПЕМ до 100 мкг викликало достовірне (p<0,01) пригнічення життєздатності клітин експериментальної гліоми 101.8 (таблиця). Присутність у культуральному середовищі ПЕМ в концентрації 100 мкг супроводжувалась значною цитотоксичною дією на клітини гліоми. Цитотоксичний індекс складав 43,30±10,8% (таблиця).

При дослідженні дозозалежного впливу пептидів із нейроклітин щура Е17 в тестах *in vitro* на клітини внутрішньомозкових пухлин людини різного ступеня анаплазії виявлено, що добова інкубація суспензії клітин пухлин ЦНС з ПЕМ в концентрації 100 мкг зменшує кількість життєздатних клітин на 43,1±14,5% в суспензії гліом II ступеня анаплазії та на 26,6±9,2% – в суспензії гліом III ступеня анаплазії. ПЕМ також індукують цитотоксичний вплив на клітини суспензії гліом II–III ступенів анаплазії. У цих групах спостережень ЦІ складав в середньому 31,9 та 37% відповідно, що, можливо, обумовлено імунобіологічними властивостями даних клітин. Цитоток-

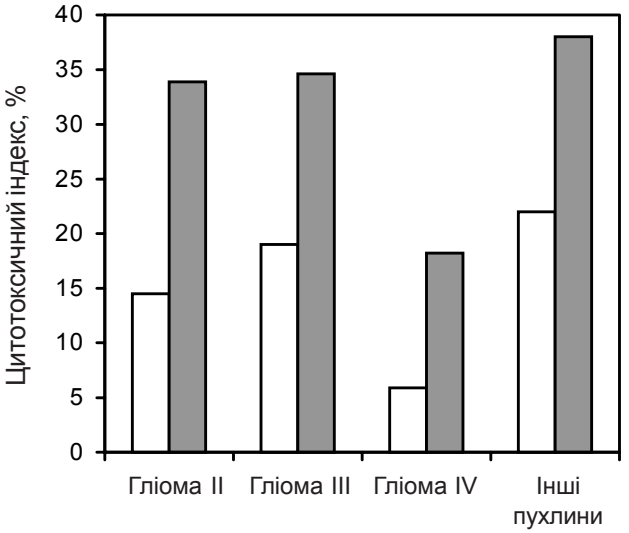


**Рис. 1.** Цитотоксичний вплив *in vitro* ПЕМ щура (Е17) на клітини пухлин ЦНС (за даними МТТ-тесту). □ – 10 мкг; ■ – 100 мкг.

сична дія цієї концентрації ПЕМ була менш вираженою в тесті з клітинами гліобластом (рис.1).

Слід зазначити, що ПЕМ в дозі 10 мкг не виявили значної цитотоксичної дії на пухлинні клітини різного генезу, оскільки в жодному випадку досліджень ЦІ не перевищував 25% (рис.1).

Подібний характер цитотоксичного впливу ПЕМ на пухлинні клітини гліом спостерігався також в первинних культурах. У контрольних культурах гліом в перші 24 год відзначалися розрідження первинних мікроагрегатів та міграція біполярних фібробластів і гістіоцитів, які з 2–3 доби поступово дегенерували та десквамувалися. В той же час навколо мікроексплантатів формувалася зона росту пухлинних гліоцитів з поодинокими клітинами у стані дистрофії та некробіозу. В дослідних культурах астроцитом (II ступеня злоякісності) після 24-годинної інкубації з ПЕМ у концентраціях 10 та 100 мкг кількість дегенеруючих клітин збільшувалася. В їх цитоплазмі спостерігалися ознаки ліпідної та гідропічної трансформації. Через 48 год деструктивні зміни в культурах охоплювали переважну більшість клітин, які поступово десквамувалися .

На відміну від культур астроцитом у дослідних культурах гліобластом після 24-годинної інкубації з ПЕМ загальна структура зони росту не зазнавала грубих змін, лише в деяких пухлинних клітинах визначалися закруглення цитоплазми з втратою відростків та накопичення ліпідних включень у цитоплазмі. Після 48-годинної інкубації цих культур з ПЕМ спостерігалася лише поява осередків розрідження зони росту за рахунок десквамації дегенерованих клітин, але на більшому просторі зона росту гліобластом зберігала звичайну будову.

Таким чином, ефективність цитотоксичного впливу ПЕМ виявилася більшою в культурах астроцитом II ступеня анаплазії порівняно з гліобластомами.

Відомо, що розвиток пухлинного процесу супроводжується значними порушеннями в системі імунітету [3, 7, 10, 12], яким належить значна роль у формуванні протипухлинної резистентності організму. Тому використання препаратів, які поряд з протипухлинною дією мають імуномодулюючі властивості та здатні відновлювати активність імунних реакцій організму-пухлиноносія, може приводити до покращення результатів лікування нейроонкологічних хворих.

Відповідно даним рис. 2 виявлено, що у нейроонкологічних хворих пригнічується спонтанна продукція супероксидного аніона ($O_2^-$) мононуклеарами периферичної крові (рис. 2, а). При цьому у хворих з гліомами III–IV ступенів анаплазії відмічається також зменшення продукції токсичного ради-

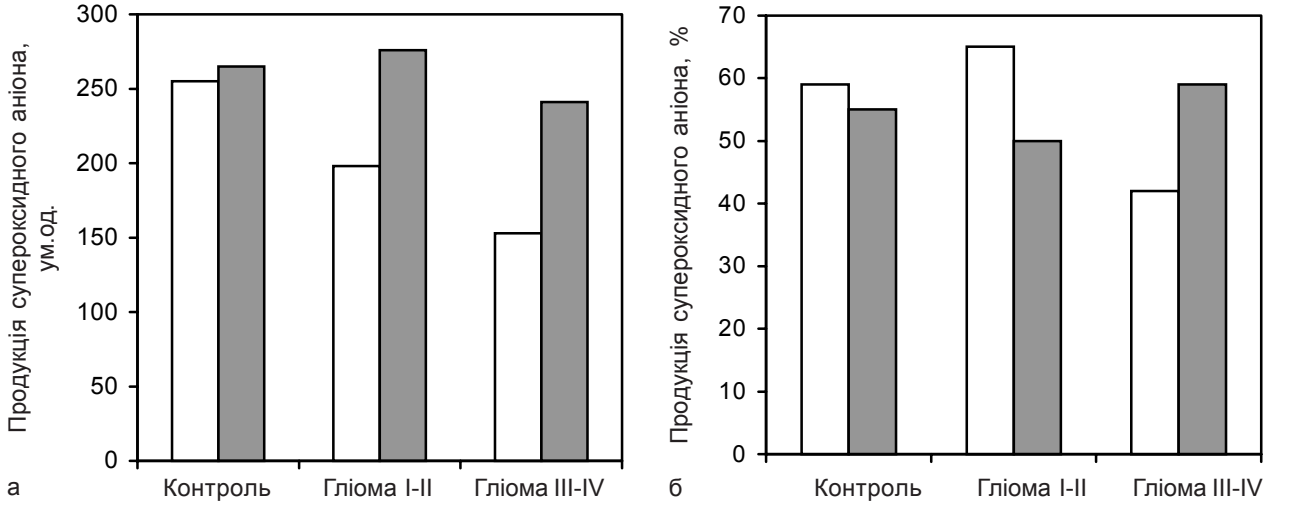


**Рис. 2.** Вплив ПЕМ щура (Е17) на фагоцитарну активність периферичних мононуклеарів: спонтанну (а) та стимульовану (б) продукцію супероксидантного аніона мононуклеарами периферичної крові. □ – групи порівняння; ■ – ПЕМ.

кала кисню у відповідь на додатковий стимул – зимозан, що свідчить про пригнічення функціонально-метаболічного резерву клітин моноцитарно-макрофагального ряду (рис. 2, б). Аналіз результатів дослідження залежності „доза-ефект" показав, що застосування ПЕМ в концентрації 100 мкг вірогідно ($p<0,05$) підвищує спонтанну продукцію супероксидного радикала мононуклеарами нейроонкологічних хворих (рис. 2) та сприяє нормалізації стимульованої продукції $O_2^-$.Таким чином, проведені дослідження показали, що пептиди, отримані з нервової тканини ембріонів щурів (Е17), дозозалежно підвищують активність клітин неспецифічного імунітету у нейроонкологічних хворих і в більшості випадків справляють цитотоксичний вплив на клітини гліальних пухлин *in vitro* в короткостроковій суспензійній культурі та довготривалих первинних культурах. Подальше експериментальне дослідження біологічної дії пептидів із ембріонального мозку на ріст перевивної гліоми мозку щурів та в умовах культивування пухлин надасть можливість розробити показання для клінічного використання ПЕМ в нейроонкології та при лікуванні нейродегенеративних захворювань ЦНС.

### Висновки

1. В тестах *in vitro* ПЕМ щура (Е17) мають пряму цитотоксичну дію на клітини експериментальної гліоми (штам 101.8) та пухлин головного мозку людини. Рівень протипухлинного впливу має дозозалежний ефект.

2. В концентрації 100 мкг ПЕМ щура (Е17) посилюють спонтанну продукцію супероксидного радикала мононуклеарів нейроонкологічних хворих у тестах *in vitro*.

## Література


1. *Анисимов В.Н., Мирецкин Г.Н., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х.* Влияние полипептидных факторов Тимуса и Эпифиза на радиационный канцерогенез // Бюл. эксперим. биологии и медицины.– 1992.– №7.– С. 80–82.
2. *Авходиев Г.И., Кузьмина О.В.* Современные представления о цитомединах // Судебно-медицинская экспертиза.– 2004.– №3.– С. 40–43.
3. *Бережная Н.М., Чехун В.Ф.* Иммунология злокачественного роста.– Киев: Наукова думка, 2005.– 791 с.
4. *Божкова В.П., Брежестовский Л.А., Буравлев В.М. и др.* Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы.– М: Наука, 1988.– 318 с.
5. *Веснина Л.Е, Кайдашев И.П.* Особенности воздействия пептидного комплекса почек на экспрессию детерминант лимфоцитов, обработанных интерлейкином-2 и гидрокортизоном // Иммунология.– 2000.– №2.– С. 17–21.
6. *Гордиенко С.М.* Сравнительная оценка результатов восстановления нитросинего тетразолия при микроскопическом и спектрофотометрическом варианте метода с различными солями тетразолия // Лаб. дело.–1983.– №2.– С. 21–27.
7. *Зозуля Ю.П., Лісяний М.І.* Нейрогенний імунодефіцит при вогнищевих ураженнях головного мозку та його клінічне значення // Журн. АМН України.– 1998.– Т. 4, №1.– С. 44–63.
8. *Кайдашев И.П., Картушов А.В., Цебрижский О.И., Мищенко В.П.* К механизму действия тканевых полипептидов // Физиология и патология гемостаза: Тез. Всесоюз. конф.– Полтава, 1991.– С. 32–34.
9. *Лісяний М.І., Бєльська Л.М.* Імуносупресуючий вплив злоякісних пухлин // Український нейрохірургічний журн.– 2007.– №1.– С. 4–9.
10. *Лисяный Н.И., Маркова О.В., Главацкий А.Я., Бельская Л.Н.* Содержание FcrRIII-положительных клеток в глиомах разной степени злокачественности // Иммунология.– 1999.– №4.– С. 56–58.
11. *Лісяний М.І., Маркова О.В., Семенова В.М., Олейник Г.М.* Вивчення *in vitro* та *in vivo* протипухлинної дії клітин головного мозку різного віку // Журн. АМН України.– 1999.– Т. 5, №2.– С.328–337.
12. *Лісяний М.І., Бичкова С.А., Гнєдкова І.О., Любич Л.Д.* Застосування індукторів інтерферона в комбінованому лікуванні гліом головного мозку // Імунологія та алергологія.– 2004.– №1.– С. 38–39.
13. *Розуменко В.Д.* Нейроонкология: современное состояние проблемы // Онкология.– 2006.– №2.– С. 188–191.
14. *Семенова В.М., Цымбалюк В.И., Стайно Л.П. и др.* Изучение противоопухолевых свойств различных популяций клеток головного мозга в культуре нервной ткани *in vitro*: В кн. Иммунная система головного мозга.– Киев, 1999.– С. 136-146.
15. *Фримель Г.* Иммунологические методы.– М.: Медицина, 1987.– 474 с.
16. *Щелканов М.Ю., Сахурия И.Б., Бурунова В.В. и др.* Дегидрогеназная активность ВИЧ-инфицированных клеток при анализе результатов МТТ-теста // Иммунология.– 1999.– №1.– С. 37–41.
17. *Патент №4170643/28-14.* Способ получения из сыворотки крови иммуностимулирующего вещества / Н.И. Лисяный, Л.В. Курганова. Заявлено 14.11.86. Опубл. 22.12.88. Гос. комитет по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР.
18. *Staflin K., Honeth G., Kalliomäki S. et al.* Neural progenitor cell lines inhibit rat tumor growth *in vivo* // Cancer Res.– 2004.– Vol. 64, N15.– P. 5347–5354.
19. *de Vries J.E., van Benthen M., Rümke P.* Separation of viable from nonviable tumor cells by flatation a ficoll friosil mixture // Transplantation.– 1973.– Vol. 15, N4.– P. 409–410.
20. *Yang S.Y., Liu H., Zhang J.N.* Gene therapy of rat malignant gliomas using neural stem cells expressing IL-12 // DNA Cell Biol.– 2004.– Vol. 23, N6.– P. 381–389.


*Надійшла 01.07.2008*