

Міністерство освіти і науки України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

**ЛЮБИЧ ЛАРИСА ДМИТРІВНА**

УДК 611-013.7/.8-018.8:612.017.1:57

**ІМУНОБІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НЕЙРОГЕННИХ КЛІТИН  
ФЕТАЛЬНОГО МОЗКУ**

03.00.09 – імунологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Державній установі «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова Національної академії медичних наук України».

**Науковий консультант:** доктор медичних наук, професор, член-кореспондент НАМН України

**Лісяний Микола Іванович,**

Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова Національної академії медичних наук України», начальник відділу нейроімунології.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор

**Бичкова Ніна Григорівна,**

Науково-дослідний інститут експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О.Богомольця МОЗ України, головний науковий співробітник лабораторії імунології та молекулярної біології;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

**Гаркава Катерина Григорівна,**

Навчально-науковий інститут екологічної безпеки Національного авіаційного університету МОН України, завідувач кафедри біотехнології;

доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

**Співак Микола Якович,**

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, завідувач відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів.

Захист відбудеться «*26*» *квітня* 2018 року о 14<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01033, Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала №12.

Автореферат розісланий «*23*» *березня* 2018 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24



Н.Г.Ракша

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Імунобіологічні властивості нейрогенних клітин фетального мозку є важливою та недостатньо вивченою проблемою імунології, яка потребує поглибленого дослідження для обґрунтування і розробки новітніх підходів до лікування захворювань центральної нервової системи (ЦНС). Актуальність цього напрямку визначається інтенсивним розвитком технологій клітинної терапії різних уражень ЦНС із застосуванням нейрогенних стовбурових клітин (НСК) та нейрогенних прогеніторних клітин (НПК) [Hsu Y.C., 2013; Gonzalez R., 2016; Amodeo V., 2017]. Перспективність таких розробок обумовлена здатністю НСК / НПК, отриманих з фетальних тканин, до диференціювання у всі типи клітин нервової системи та міграції до місць уражень у ЦНС, у тому числі гліальних пухлин мозку [Aboody K.S., 2013; Teng J., 2014; Miska J., 2015; Varish M.E., 2017]. На експериментальних моделях патологій ЦНС встановлено функціональне відновлення, клінічне поліпшення та подовження життя після трансплантації НСК / НПК [Chen L., 2016; Sun D., 2016; Ye L., 2016; Zhao Y., 2016]; розпочато клінічні рандомізовані контрольовані випробування (фаза I/II) щодо безпечності та ефективності застосування цих клітин при захворюваннях ЦНС [Curtis E., 2016; Kalladka D., 2016; Meamar R., 2016; Novak I., 2016; Yousefifard M., 2016; Portnow J., 2017].

Фундаментальні механізми впливу екзогенних нейрогенних клітин при трансплантації на клітини мозку та імунної системи залишаються недостатньо вивченими. Припускають, що трансплантовані НСК / НПК можуть чинити ремодельовальну дію, розмножуючись у тканині мозку і вбудовуючись у клітинні системи, або трофічну і нейропротекторну дію, а також імуномодуляторний вплив [Ottoboni L., 2015; Drago D., 2016; Jablonska A., 2016; Gao M., 2017]. Існують окремі повідомлення про здатність НСК / НПК експресувати і продукувати досить широкий спектр імуноактивних молекул [Liu J., 2013; Ulrich H., 2015; Vacigaluppi M., 2016]. Попри це механізми взаємодії між імунною системою реципієнта і пересадженими клітинами потребують поглиблених досліджень. Дискусійними та контроверсійними залишаються питання гістосумісності аlogenних НСК / НПК з організмом реципієнта та їх здатності активувати реакції трансплантаційного імунітету: інтенсивності експресії цими клітинами антигенів головного комплексу гістосумісності I та II типів, довготривалого виживання алотрансплантатів та механізмів відторгнення донорських НСК / НПК.

Водночас досліджується можливість застосування НСК / НПК як засобів таргетної терапії злоякісних пухлин мозку [Aboody K.S., 2013; Vovenberg M.S., 2013; Morshed R.A., 2015; Varish M.E., 2017] та індукції довгострокової протипухлинної відповіді через стимулювання імунної системи і доставки в пухлини різних біологічних агентів [Kim J.W., 2015; Namba H., 2016; Portnow J., 2017]. Зазначені підходи ґрунтуються на здатності НСК / НПК мігрувати до злоякісних гліом та індукувати загибель пухлинних клітин у тварин; пролонгувати їх виживання та гальмуючи ріст пухлини [Staflin K., 2007; Bagó J.R., 2016; Liu S., 2016], однак механізми протипухлинних ефектів НСК / НПК залишаються невизначеними.

З'ясування основних механізмів реалізації імуномодуляторного та протипухлинного потенціалу НСК / НПК як складової перспективних новітніх напрямків лікування патології ЦНС необхідне для об'єктивної оцінки імунообумовлених наслідків післятрансплантаційних ефектів цих клітин та пошуку шляхів оптимізації їх застосування

у розробці способів біо- та імунотерапії пухлин головного мозку. Комплексні імунологічні дослідження антигенних, імуногенних, імуномодулювальних та протипухлинних властивостей нейрогенних клітин фетального мозку, особливостей імунної відповіді на алотрансплантацію НСК / НПК та її ролі у збереженні або загибелі алогенних клітин уможливають аргументовану оцінку їх використання при захворюваннях ЦНС та визначають необхідність імуносупресії при нейротрансплантації. Надзвичайно важливим є дослідження загальнобіологічних механізмів протипухлинної дії нейрогенних клітин фетального мозку та продукованих ними гуморальних медіаторів. До останнього часу продуковані НСК / НПК біологічно активні речовини у складі кондиційованого середовища культивування цих клітин практично не розглядались як чинники їх імуномодулювального і протипухлинного впливу. Оскільки збагачене біологічно активними факторами кондиційоване середовище НСК / НПК може вважатись ключовим компонентом мікрооточення («ніші») цих клітин, то залежно від етапу їх розвитку воно може відповідним чином впливати на процеси проліферації, диференціації та виживання або апоптозу пухлинних клітин гліоми. Вкрай актуальною лишається також проблема пошуку шляхів підвищення ефективності комплексного патогенетичного лікування злоякісних гліом головного мозку з використанням нейрогенних клітин фетального мозку у складі таргетної індивідуалізованої терапії та удосконалення способів імунотерапії гліом.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційне дослідження виконане в Державній установі «Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України» (ДУ «ІНХ НАМН») в межах планових науково-дослідних робіт, в яких автор була відповідальним виконавцем або виконавцем окремих фрагментів: «Вивчити нейробластні шляхи диференціювання стовбурових клітин і розробити методи їх регіонарного застосування при вогнищевих ураженнях нервової системи» (№ д/р 0102U003252 (2002-2004 рр.); «Вивчити вплив внутрішньомозкової імплантації гліальнозбагачених фракцій неокортексу, мозочка і стовбурових клітин на морфологічну пластичність і метаболізм мозку та визначити ефективність їх застосування при вогнищевих ураженнях ЦНС» (№ д/р 0102U003241 (2002-2004 рр.); «Вивчити модулюючий та апоптичний вплив злоякісних пухлин головного мозку різного генезу на імунну систему та розробити способи активації протипухлинного імунітету» (№ д/р 0104U000409 (2004-2006 рр.); "Дослідити імуномодулюючу активність стовбурових нейроклітин в процесі їх диференціювання *in vitro*" (№ д/р 0105U000902 (2005-2007 рр.); «Дослідити порушення метаболізму негемового заліза і оксиду азоту в головному мозку при формуванні епілептичного вогнища» (№ д/р 0105U000901 (2005-2007 рр.); "Дослідження порушень протипухлинної ланки імунної системи при злоякісних пухлинах головного мозку та їх корекція біологічними та імуномодулюючими чинниками" (№ д/р 0107U001191 (2007-2009 рр.); «Вивчити значення стану імунної системи в реакціях імунного відторгнення алогенних ембріональних клітин в експерименті" (№ д/р 0107U012771 (2008-2010 рр.); "Дослідити вплив прогеніторних клітин на перебіг запально-дегенеративних уражень ЦНС та розробити диференційовані методи їх лікування" (№ д/р 0110U002191 (2010-2012 рр.); «Визначити зміни рівня експресії трансформуючого фактора росту бета у клітинах культивованих гліом за умов антипроліферативного впливу супернатанту фетальних нейрогенних клітин щура» (№ д/р 0114U006179 (2014-2015 рр.).

**Мета і задачі дослідження:** визначення імунобіологічних і протипухлинних властивостей нейрогенних клітин фетального мозку та їх гуморальних чинників.

**Для досягнення мети було поставлено такі задачі:**

1. Розробити спосіб отримання та культивування нейрогенних клітин з фетального головного мозку.
2. Дослідити експресію маркерних протеїнів (нестину, промініну-1 (CD133), віментину, гліального фібрилярного кислого білка (GFAP), нейронспецифічної енолази (NSE), основного білка мієліну (ОБМ) нейрогенними клітинами фетального мозку в процесі культивування *in vitro*.
3. Дослідити експресію антигенів гістосумісності I та II типів нейрогенними клітинами фетального мозку в динаміці культивування *in vitro*.
4. Порівняти імуногенність нейрогенних клітин фетального мозку та клітин лімфовузлів і головного мозку дорослих тварин при різних способах їх введення в експерименті.
5. Оцінити вплив імуносупресії на інтенсивність алоспецифічних і нейроспецифічних імунних реакцій у тварин-реципієнтів алогенних фетальних нейроклітин.
6. Дослідити морфологічні зміни головного мозку тварин-реципієнтів у відповідь на внутрішньомозкове введення алогенних і сингенних фетальних нейроклітин та кореляційні співвідношення з системними імунними реакціями.
7. Вивчити імуномодульовальні властивості гуморальних факторів у складі кондиційованого середовища нейрогенних клітин фетального мозку щура *in vitro* та *in vivo*.
8. Дослідити вплив кондиційованого середовища нейрогенних клітин фетального мозку щура на клітини пухлин головного мозку *in vitro*.
9. Визначити ефекти кондиційованого середовища нейрогенних клітин фетального мозку щура *in vivo* у тварин з експериментальною гліомою головного мозку при різних режимах введення.
10. Встановити чинники біологічних ефектів кондиційованого середовища нейрогенних клітин фетального мозку щура.

*Об'єкт дослідження* – імунна та біологічна активність нейрогенних клітин фетального мозку.

*Предмет дослідження* – фенотипові, антигенні та імуногенні характеристики, імуномодульовальні та протипухлинні (цитотоксичні, проапоптотичні, антими́тотичні, антипроліферативні) ефекти нейрогенних клітин фетального мозку.

*Методи дослідження* – імунологічні (імуноцитохімічне та імунофлуоресцентне визначення експресії фенотипових маркерів; імуноферментний аналіз (ІФА) вмісту цитокінів та антитіл до нейроспецифічних антигенів; визначення цитотоксичної активності імуноцитів та алоспецифічних антитіл), *молекулярно-біологічні* (визначення експресії мРНК молекул гістосумісності, цитокінів за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією), *біохімічні* (отримання фракціонуванням нейроспецифічних білків, електрофоретичне визначення складу кондиційованого середовища нейрогенних клітин фетального мозку щура), *цитологічні* (цитофлуориметричне визначення життєздатних та апоптичних клітин), *культивування клітин in vitro*, *морфологічні методи* (світлова мікроскопія (оглядові і спеціальні методики) цитологічних препаратів культур клітин та гістологічних препаратів головного

мозку дослідних тварин, морфометричний аналіз), *методи експериментального моделювання* (відтворення та моніторинг алоспецифічних імунних реакцій у лінійних тварин, перещеплення гліоми з наступною оцінкою виживаності), *статистичні методи*. Усі дослідження проведено з дотриманням норм біологічної безпеки та принципів біоетики (протокол № 2 від 2.04.2007 р. Комітету з біоетики ДУ «ІНХ НАМН»).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше на основі проведених досліджень визначено роль імунобіологічних і протипухлинних властивостей нейрогенних клітин фетального мозку та їх гуморальних чинників у формуванні системних реакцій трансплантаційного і протипухлинного імунітету.

Розширено існуючі уявлення щодо імуногенності нейрогенних клітин фетального мозку та експресії ними антигенів гістосумісності. Показано зниження їх експресії за умов культивування клітин *in vitro* в присутності ретинола ацетату.

Отримано нові дані про здатність нейрогенних клітин фетального мозку викликати реакції трансплантаційного та нейроспецифічного імунітету *in vivo*. Продемонстровано зменшення проявів алоімунної агресії у відповідь на введення нейрогенних клітин за умов імуносупресії циклоспорином А.

Уперше в експерименті у тварин-реципієнтів після внутрішньомозкового введення фетальних алогенних нейроклітин показано, що розвиток нейроспецифічної імунної відповіді асоційований з морфологічними змінами тканини головного мозку, що доводить участь антитіл до нейроантигенів, поряд з антитілами до алоантигенів, у механізмах імунного відторгнення трансплантованих клітин в імунонескомпроментованому організмі.

Вперше доведено, що КСНК фетального мозку щура чинить дозозалежний цитотоксичний, антими́тотичний та антипроліферативний вплив на культивовані клітини гліом, знижує здатність клітин гліоми до індукції пухлини *in vivo*, посилює імунну реактивність тварин з пухлинами та подовжує їх тривалість життя. Доведено протипухлинну ефективність алогенної пухлинної вакцини, модифікованої КНСК, у тварин з експериментальною гліомою головного мозку.

**Практичне значення отриманих результатів.** На підставі отриманих в дисертаційному дослідженні даних розроблено спосіб отримання клітинної суспензії, збагаченої НСК / НПК (Деклараційний патент України на винахід 71388 А від 15.11.2004). Розроблено способи оцінки алоспецифічних клітинних імунних реакцій та нейроспецифічних аутоімунних реакцій у відповідь на трансплантацію нейрогенних клітин (Патенти України на корисну модель № 75057, № 75059 від 26.11.2012), які можуть бути рекомендовані для моніторингу імунобумовлених наслідків післятрансплантаційних ефектів цих клітин. Встановлене зниження проявів реакцій трансплантаційного імунітету за впливу циклоспорину А обґрунтовує показання до застосування імуносупресивних препаратів при нейротрансплантації алогенних клітин фетального мозку.

Експериментально доведено, що первинні культури гліом головного мозку є адекватною моделлю для оцінки протипухлинної дії кондиційованого середовища, отриманого від фетальних нейрогенних клітин, і можуть бути використані для визначення індивідуальної чутливості пухлинних клітин до його впливу. Встановлені в дисертаційному дослідженні протипухлинні ефекти кондиційованого середовища нейрогенних клітин *in vitro* та *in vivo* створюють підґрунтя для розробки способів застосування біопрепаратів,

одержаних з фетальних нейрогенних клітин, у комплексній патогенетичній терапії хворих з гліомами.

Наукові розробки дисертаційної роботи впроваджено в роботу відділу нейроімунології та лабораторії культивування тканин ДУ «ІНХ НАМН». Основні наукові результати дослідження включені у лекційний курс з нейрохірургії кафедри нейрохірургії Національного медичного університету імені О.О.Богомольця.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. Здобувачем особисто запропоновано ідею дослідження, сформульовано мету і завдання, проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз наукової літератури щодо імунобіологічних властивостей нейрогенних клітин фетального мозку. Дисертантом самостійно виконані експериментальні дослідження на тваринах та лабораторні імунологічні, молекулярно-генетичні, біохімічні, цитологічні дослідження, проведено культивування нейрогенних фетальних клітин. Дисертантом особисто проведено первинну обробку результатів досліджень, їх аналіз, інтерпретацію та статистичну обробку, сформульовано висновки. Всі розділи дисертації написано та оформлено автором особисто. Матеріали та положення кандидатської дисертації автора не використовувалися в її докторській дисертації.

Автор висловлює щиру подяку співробітникам лабораторії культивування тканин та відділу нейропатоморфології ДУ «ІНХ НАМН» за методичну допомогу у виконанні морфологічних досліджень. Автор висловлює щиру подяку науковому консультанту д.мед.н., професору, члену-кореспонденту НАМН України Лісяному М.І. за участь у обговоренні результатів дослідження, наукових положень та висновків дисертації.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення та результати дисертаційної роботи оприлюднено на XIII Всеросійській конференції «Нейроиммунология» 24-27 травня 2004 р. (м. С.-Петербург, РФ), міжнародному симпозиумі з біології клітини в культурі “Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия” 25-27 жовтня 2004 р. (м. С.-Петербург, РФ); Всеросійському симпозиумі «Биология клетки в культуре» 17-19 жовтня 2006 р. (м. С.-Петербург, РФ); XVI Всеросійській конференції «Нейроиммунология» 23-26 травня 2007 г. (м. С.-Петербург, РФ); II з’їзді Товариства клітинної біології сумісно з ювілейною конференцією, присвяченою 50-річчю Інституту цитології РАН, 16-19 жовтня 2007 р. (м. С.-Петербург, РФ); IV з’їзді нейрохірургів України 27-30 травня 2008 р. (м. Дніпропетровськ); науково-практичній конференції за участі міжнародних спеціалістів «Трансплантація органів, тканин та клітин» 20-21 листопада 2008 р. (м. Київ); Всеросійському симпозиумі з біології клітини в культурі «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий» 12-14 жовтня 2009 р. (м. С.-Петербург, РФ); науково-практичній конференції нейрохірургів України за участю НДІ нейрохірургії ім. акад. М.Н. Бурденка РАМН «Проблеми реконструктивної та відновної нейрохірургії» 7–8 жовтня 2010 р. (м. Партеніт, АР Крим); X Ювілейній Всеросійській науково-практичній конференції «Поленовские чтения» 19-22 квітня 2011 р. (м. С.-Петербург, РФ); XII з’їзді онкологів України 20-22 вересня 2011 р. (м. Судак, АР Крим); конференції «Клеточные технологии для регенеративной медицины» 17-25 жовтня 2011 р. (м. С.-Петербург, РФ); 3-му з’їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом 16-20 травня 2012 р. (м. Ялта, АР Крим); науковій конференції "Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины" 18-19 жовтня 2012 р. (м. Харків); VI щорічному міжнародному симпозиумі «Актуальные вопросы генных и

клеточных технологий» 11-12 жовтня 2013 р. (м. Москва, РФ); Всеросійському симпозиумі з біології клітини в культурі 23-25 жовтня 2013 р. (м. С.-Петербург, РФ); XX Всеросійській конференції «Нейроиммунология. Рассеянный склероз» 28-31 травня 2015 р. (м. С.-Петербург, РФ); міжнародній конференції “Advances in cell biology and biotechnology” 11-13 жовтня 2015 р. (м. Львів); 5-му з’їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом 2-6 жовтня 2016 р. (м. Одеса); 7-й міжнародній Вайглівській конференції 26-29 вересня 2017 р. (м. Львів); міжнародній науковій конференції «Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy» 5-6 жовтня 2017 р. (м. Київ).

Апробація відбулася на спільному засіданні Вченої ради Державної установи «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова НАМН України», кафедр нейрохірургії Національного медичного університету імені О.О.Богомольця та Національної академії післядипломної освіти ім.П.Л.Шупика 24 травня 2017 р., протокол № 13.

**Публікації.** За результатами дисертації опубліковано 62 наукові праці, у тому числі 36 статей (6 одноосібних), з яких 24 – у фахових періодичних виданнях (біологічні науки), рекомендованих МОН України, серед них 11 – у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз (1 – Web of Science, 7 – Scopus; 3 – Index Copernicus), 6 – у наукових періодичних іноземних виданнях, 6 – у фахових виданнях (медичні науки), 1 – розділ монографії (одноосібний), 1 деклараційний патент України на винахід, 3 патенти України на корисну модель, 21 тези доповідей на з’їздах, симпозиумах, конференціях (18 – вітчизняних з міжнародною участю або за кордоном).

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів, восьми розділів власних досліджень, узагальнення, висновків, 4 додатків. Загальний обсяг дисертації становить 472 сторінки; основну частину роботи викладено на 299 сторінках, ілюстровано 78 рисунками, 55 таблицями. Список посилань містить 529 найменувань, з них 106 – кирилицею та 423 – латиною.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи досліджень.** Досліди виконані на тваринах, які утримувались за стандартних умов акредитованого віварію ДУ «ІНХ НАМН», згідно з принципами біоетики, законодавчих норм та вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), і Закону України №3447 IV “Про захист тварин від жорстокого поводження», та зразках клітин з банків клітинних культур, клітин периферичної крові, тканини пухлин головного мозку і фрагментів різних відділів перифокальної зони пухлини відповідно до вимог Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації з біоетики та прав людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв’язку з впровадженням нових біомедичних технологій (Іспанія, 1997). Нейроклітини людини (5–12-й тиждень гестації) були люб’язно надані кріобанком Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, зразки клітин експериментальних гліом щура 101.8 – з Всеросійської колекції клітинних культур Інституту морфології людини РАН (РФ), С6 – з Клітинного банку ліній тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України. Дослідження клітин

периферичної крові та зразків біопсій пухлин головного мозку і фрагментів різних відділів перифокальної зони пухлини (по ходу доступу фрагменти тканини нюхової цибулини (НСЦ), кори та білої речовини головного мозку) проведені в рамках виконання вищезазначених науково-дослідних робіт ДУ «ІНХ НАМН» (№№ д/р 0104U000409, 0105U000902, 0107U001191). Прилади, використані для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Нейрогенні фетальні клітини експериментальних тварин отримували з тканини головного мозку, вилученої в стерильних умовах з плодів (Е8-16) наркотизованих самиць у визначений термін вагітності. Первинні культури з тканин головного мозку і зразків пухлин отримували культивуванням клітин ( $1 \cdot 10^6$ ) на покривних адгезивних скельцях, вкритих поліетиленіміном ("Sigma", ФРН), у чашках Петрі в середовищі 199 та DMEM (1:1, 2 мл) з додаванням 10 % ФТС, 400 мг% глюкози та 0,2 од/мл інсуліну. Для цитологічного дослідження клітин культури фіксували 10 % формаліном і забарвлювали гематоксилином Караччі та тіоніном за Нісслем.

У серії експериментів *in vivo* для відтворення алоспецифічних і нейроспецифічних імунних реакцій реципієнтам (миші лінії С57В1/6, самці, вік 1,5 міс, вага ( $22,7 \pm 0,8$ ) г) внутрішньоочеревинно або внутрішньомозково (стандартно у праву скроневу ділянку головного мозку на глибину 1,5-2,0 мм) вводили суспензії клітин ( $0,1$  мл,  $1 \cdot 10^6$ ) різних тканинних типів від тварин-донорів: клітини лімфовузлів та нейроклітини головного мозку дорослих мишей СВА (самиці, вік 1,5 міс, вага ( $22,7 \pm 0,8$ ) г), НПК фетального мозку (плодів Е13-15) мишей СВА та С57В1/6. Частині реципієнтів здійснювали імуносупресію циклоспорином А (5 мг/кг, «Novartis Pharma AG», Швейцарія) на 0-у, 3-ю, 6-у добу експерименту. Імунологічні дослідження проведені через 6, 12, 18 та 37 діб після початку експерименту, морфологічні дослідження тканини головного мозку – через 24 год, 6, 12, 18 та 37 діб. Визначали у динаміці стан ефекторної ланки алоспецифічної (цитотоксична активність (ЦА) імуноцитів та антитіл) та нейроспецифічної (кількість антитіл до нейроспецифічних білків (НСБ) імуноної відповіді. Алоспецифічну ЦА імуноцитів визначали у МТТ-тесті за розробленою модифікацією (патент України на корисну модель № 75059), використовуючи як клітини-ефектори імуноцити лімфовузлів мишей-реципієнтів С57В1/6 експериментальних груп, а як клітини-мішені – імуноцити лімфовузлів мишей-донорів СВА у співвідношенні 5:1 (ефективне). Для дослідження ЦА алоспецифічних антитіл клітини-мішені (імуноцити лімфовузлів мишей-донорів СВА) інкубували з сироватками (1:10) мишей-реципієнтів С57В1/6 з додаванням комплементу мурчака 24 год при  $37^0$  С та проводили МТТ-тест. Реєстрацію результатів здійснювали фотометрично при 570 нм та вираховували цитотоксичний індекс (ЦІ) алоспецифічної ЦА.

Кількість антитіл до НСБ (ОБМ, S-100, NSE) у сироватці крові мишей-реципієнтів визначали методом твердофазного ІФА за допомогою розробленої тест-системи (патент України на корисну модель № 75057).

*Кондиційоване середовище нейрогенних клітин (КСНК)* фетального мозку отримували з суспензій ( $6,0 \cdot 10^6$ /мл) нейрогенних клітин мозку щура на 8-11-у (Е8-11) та 12-16-у (Е12-16) добу гестації. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі та стандартизували до 1,0 мг/мл. Для визначення складу КСНК проводили електрофорез у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) та ІФА вмісту цитокінів – фактора некрозу пухлин (TNF)- $\alpha$ , інтерлейкінів (IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\alpha$ , трансформувального ростового фактора

(TGF)- $\beta$ 1 («Diaclone», Франція), мозкового нейротрофічного фактора (BDNF, «Thermo Fisher Scientific», США).

Для дослідження впливу *in vitro* КСНК (0,02, 0,10 мг/мл) додавали до суспензій клітин ( $2,0 \cdot 10^6$ , 2 мл) пухлин та мононуклеарів периферичної крові (МНПК) та інкубували 24 год в CO<sub>2</sub>-інкубаторі. У суспензіях до та після інкубації з КСНК визначали кількість життєздатних та апоптичних клітин, Ці, експресію антигенів CD-25,-95,-54,-56, HLA-A,B,C, -DR, експресію та продукцію цитокінів.

Визначення апоптичних клітин здійснювали з використанням барвника Hoechst 33342 (0,1 мкг/мл, Sigma, США), аналізуючи пікноз, конденсацію і фрагментацію ядерного хроматину за допомогою імерсійної системи мікроскопа ЛЮМАМ (РФ, x900), та цитофлуориметричним методом з використанням пропідіума йодиду, аналізуючи фракцію клітин в зоні гістограми, що відповідає субдиплоїдному вмісту ДНК. Експресію антигенів CD25, CD-95, CD-54, CD-56, HLA-A,B,C та HLA-DR визначали непрямим імунофлуоресцентним методом з використанням моноклональних мишачих антитіл («Сорбент-сервіс», РФ) і аналізували на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur («Becton Dickinson», США).

Для визначення впливу на продукцію та експресію цитокінів КСНК (0,02, 0,10 мг/мл) додавали до суспензій МНПК або клітин гліом людини ( $2,0 \cdot 10^6$  /мл, 2 мл) та інкубували 2 год в CO<sub>2</sub>-інкубаторі, після чого клітини осаджували центрифугуванням 5 хв при 1500 об/хв, відмивали і ресуспендували у свіжому середовищі DMEM та інкубували 24 год. У супернатантах визначали методом ІФА вміст цитокінів IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 («Протеїновий контур», РФ). З клітинних суспензій виділяли РНК та визначали експресію мРНК цитокінів.

Для дослідження впливу КСНК у первинних культурах гліом до моношару клітин з рівномірною зоною росту додавали КСНК (0,01, 0,10 мг/мл), інкубували упродовж 24 та 48 год, фіксували 10 % формаліном і проводили цитоморфологічні та імуноцитохімічні дослідження. Контролем слугували культури без впливу КСНК.

Дослідження імуномодулювального впливу КСНК *in vivo* проводили після внутрішньоочеревинного введення КСНК інтактним щурам (білі нелінійні, самиці, вік 1 міс, вага ( $120 \pm 10$ ) г, 3-кратно з інтервалом в 1 добу (сумарно 1 мг/кг КСНК) та мишам (СВА, самці, вік 2 міс, вага ( $22,7 \pm 0,8$ ) г, 1-кратно (0,88 мг/кг) та 5-кратно щоденно (сумарно 4,4 мг/кг КСНК) з наступною оцінкою функційних показників імуноцитів у алогенній і ксеногенній системах (МТТ-тест з клітинами гліоми 101.8 щура).

Модель гліоми головного мозку відтворювали внутрішньомозковим введенням 0,02 мл ( $3,5 \cdot 10^5$  життєздатних клітин) нативної або модифікованої КСНК (0,02, 0,10 мг/мл) суспензії клітин гліоми 101.8 у ліву півкулю мозку наркотизованих інтактних білих щурів (нелінійні, самиці, вік 1 міс, вага ( $120 \pm 10$ ) г на глибину 1,5-2,0 мм. Проводили 3 серії експериментів: 1 – визначення впливу КСНК на пухлиноіндукувальну здатність клітин гліоми 101.8; 2 – визначення впливу КСНК на перебіг гліоми за внутрішньоочеревинного введення (3-кратно з інтервалом в 1 добу (сумарно 1 мг/кг) до (за 1 міс та 1 тиж) та після індукції пухлини); 3 – визначення впливу алогенної пухлинної вакцини (АПВ), модифікованої КСНК, на перебіг гліоми головного мозку. У тварин дослідних груп аналізували в динаміці середню тривалість життя (СТЖ), медіану виживаності та оцінювали ЦА імуноцитів селезінки (МТТ-тест з клітинами гліоми 101.8).

Імуноцитохімічне дослідження експресії клітинами специфічних маркерів здійснювали з використанням первинних антитіл до *віментину* («Sigma Immunochemicals VIMENTIN», ФРН), *нестину* («Sigma-Aldrich», США), *CD133* («Millipore», США), *GFAP* («Sigma Immunochemicals GFAP», ФРН), *NSE* і *ОБМ* (анти-NSE і анти-ОБМ кролячих антитіл, отриманих і стандартизованих у відділі нейроімунології ДУ «ІНХ НАМН»), а також *Ki-67* («Thermo Scientific», США), *TGF-β1* («Sigma», США), *p53* (anti-TP53, «Sigma-Aldrich», США) за загальноприйнятими методиками.

Експресію мРНК генів головного комплексу гістосумісності (HLA-A1a, HLA-Dra1, HLA-DQb1, трансактиватора МНС II класу (СІПА)), цитокінів (IFN-γ, TGF-β2, IL-10, IL-12), FASR та FAS визначали за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією (RT-PCR).

*Статистичний аналіз* отриманих даних проводили з використанням пакету статистичних програм "Statistica 8.0", програмне забезпечення StatSoft, Inc. (2007) згідно з рекомендаціями [Лапач С.Н., 2001; Реброва О.Ю., 2002]. Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Відповідно застосовували методи варіаційної статистики: параметричні (t-критерій Стюдента, двохвибірковий t-тест з різними дисперсіями) та непараметричні (ранговий дискримінантний аналіз ANOVA Краскела-Уолліса для множинного порівняння кількох незалежних груп, U-критерій Манна-Уїтні для попарного порівняння незалежних груп, тест Вілкоксона для попарного порівняння залежних груп (в динаміці спостереження), точний двосторонній критерій Фішера для попарного порівняння незалежних груп і критерій  $\chi^2$  для попарного порівняння залежних груп (в динаміці спостереження). Кореляційний аналіз проводили з використанням рангового критерія Спірмена. Для статистичного аналізу виживаності тварин застосовували метод множинних оцінок Каплана-Майєра з використанням критерія Вілкоксона-Гехана. Дані представлено у вигляді ( $M \pm m$ ), де  $M$  – середнє значення;  $m$  – стандартне відхилення від середнього значення;  $d$  – середнє квадратичне відхилення від середнього значення. Статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$ , статистично високозначущими – при  $p < 0,01$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Характеристика біологічних властивостей нейрогенних клітин фетального мозку *in vitro*.** За умов культивування у безсироватковому середовищі DMEM динаміка кількісних показників суспензійних культур нейрогенних клітин фетального мозку подібна: кількість клітин зменшується у 1,5–5 разів на 5–9-у добу культивування порівняно з початковою ( $p = 0,01$ , рис.1,а); частка клітин, що експресують віментин, збільшується з 2-ї до 9-ї доби від  $(28,6 \pm 3,6) \%$  до  $(88,3 \pm 13,9) \%$  ( $p = 0,03$ ). Ретинола ацетат при додаванні в культиваційне середовище (5-а доба, 0,2 мг/мл) відновлює загальну кількість клітин з 7-ї до 10-ї доби культивування ( $p = 0,01$ ; рис.1,а) і є найбільш оптимальним індуктором їх проліферації, порівняно з іншими факторами у використаних концентраціях (нейротрофічний фактор S-100, епідермальний ростовий фактор (EGF), ростовий фактор фібробластів (FGF), рис.1,б).

Упродовж культивування з 2-ї до 9-ї доби в середовищі DMEM з додаванням ретинола ацетату частка нестин-позитивних клітин становить від  $(49,16 \pm 10,60) \%$  до  $(37,78 \pm 12,17) \%$ , CD133<sup>+</sup> – від  $(37,36 \pm 12,33) \%$  до  $(45,66 \pm 14,67) \%$ , віментин-позитивних

– сягає 77,0 – 88,3 %, експресія GFAP не змінюється ( $(80,0 \pm 5,0)$  % клітин). Отже, культури нейрогенних клітин фетального мозку містять НСК, НПК, нейро- і гліобласти.

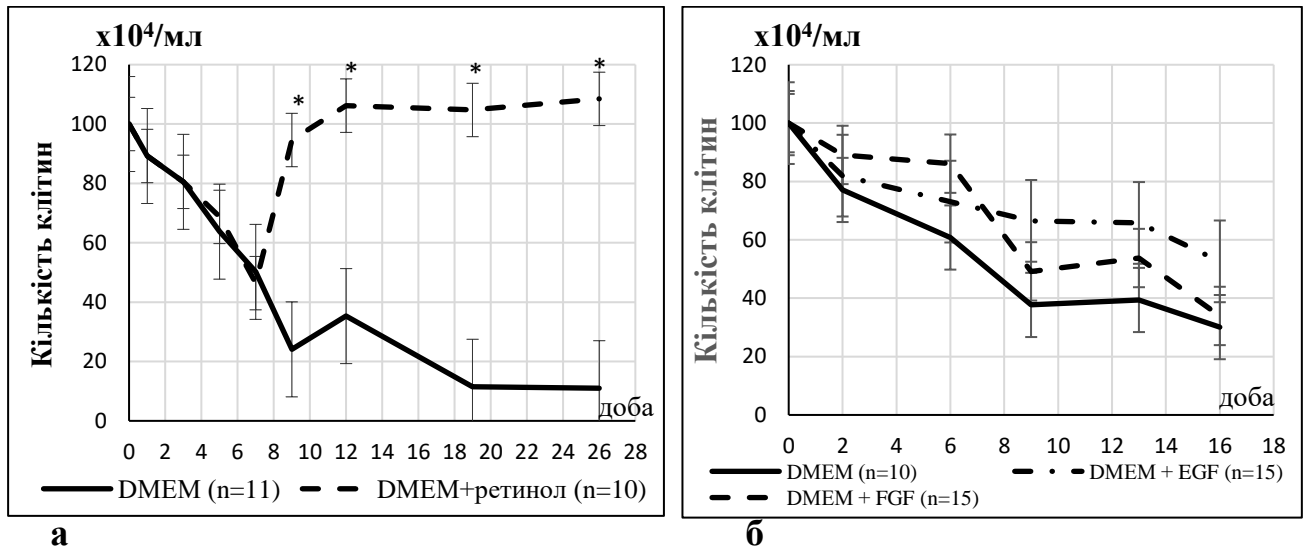


Рис.1. Динаміка кількості клітин у суспензійних культурах нейроклітин при культивуванні у безсироватковому середовищі DMEM: а – за впливу ретинола ацетату (5-а доба, 0,2 мг/мл); б – за впливу EGF (20 нг/мл) і FGF (10 нг/мл). \*- відмінності статистично значущі між групами,  $p \leq 0,01$ ; U-критерій Манна-Уїтні.

Вплив ретинола ацетату сприяє виживанню і розмноженню нейроклітин фетального мозку та індукує формування характерних упорядкованих клітинних конгломератів – «нейросфер». Послідовне застосування ретинола ацетату, адгезії до субстрату (поліетиленімін), індукторів диференціювання викликає зростання частки клітин з фенотиповими ознаками нейроцитів з  $(8,5 \pm 0,5)$  % (поєднаний вплив ретинола ацетату та інсуліну) до  $(25,0 \pm 0,5)$  % (поєднаний вплив ретинола ацетату і ретиноевої кислоти,  $p = 0,04$ , U-критерій Манна-Уїтні), які набувають найбільш виразного прояву при поєднанні ретинола ацетату, ретиноевої кислоти та 10 % ФТС.

Імуноцитохімічне забарвлення на маркерні протеїни основних типів нейроклітин (NSE, GFAP, ОБМ) підтверджує, що нейроклітини фетального мозку при культивуванні зберігають свої мультипотентні властивості до набуття фенотипових ознак нейронів (експресія NSE), астроцитів (експресія GFAP) та олігодендроцитів (експресія ОБМ).

Наші спостереження відповідають даним щодо ефектів ретинолу та ретиноевої кислоти на ріст, розмноження НСК/НПК та індукцію нейрогенного напрямку їх диференціювання внаслідок послідовної активації транскрипційних факторів ядерних рецепторів ретиноевої кислоти ( $RAR\alpha, \beta, \gamma$ ) та X-рецепторів ретиноїдів ( $RXR\alpha, \beta, \gamma$ ) [Kaulmann A., 2014; Liu Z., 2014; Mendoza-Parra M.A., 2014; Rochel N., 2014].

Під час культивування клітин фетального мозку частка клітин, позитивних на TGF- $\beta$ 1, становить від  $(22,04 \pm 2,33)$  % до  $(15,27 \pm 9,80)$  % з 2-ї по 37-у добу ( $p = 0,7$ , U-критерій Манна-Уїтні), що відповідає даним літератури [Staflin K., 2004; Chen H.C., 2010; Liu J., 2013] і засвідчує потенційні імуномодуляційні властивості цих клітин.

Таким чином, нами розроблено спосіб виділення та культивування нейрогенних клітин з фетального головного мозку і підтверджено їх мультипотентні властивості.

**Експресія антигенів головного комплексу гістосумісності нейрогенними клітинами фетального мозку.** Частка HLA-A,B,C<sup>+</sup> та HLA-DR<sup>+</sup> нейрогенних клітин зростає при збільшенні терміну гестації з 5 до 8-9 тижнів ( $p = 0,05$ ); клітини НЦ (регіонарні НСК/НПК зрілого мозку) містять меншу їх кількість, порівняно з НСК/НПК незрілого мозку ( $p = 0,04$ , U-критерій Манна-Уїтні; табл.1). Експресія мРНК HLA-A1a і HLA-DRa1 має тенденцію до зростання від повної відсутності або незначного рівня у нейроклітин 5-9-го тижнів гестації до часткової експресії у клітинах НЦ ( $p = 0,34$ ,  $p = 0,07$ ) і значної експресії у клітинах білої речовини ( $p = 0,1$ ,  $p = 0,01$ ) та кори зрілого мозку ( $p = 0,27$ ,  $p = 0,003$ ); експресія мРНК HLA-DQb1 – тенденцію до зростання у диференційованих клітинах кори і білої речовини, порівняно з НСК/НПК фетального мозку ( $p = 0,14$ ,  $p = 0,28$ , точний двосторонній критерій Фішера). Отримані результати доповнюють дані наукових джерел щодо широкого діапазону експресії НСК антигенів HLA – від відсутності [Al Nimer F., 2004; Ubiali F., 2007; Preynat-Seauve O., 2009] до незначного та суттєвого рівня експресії [Modo M., 2003; Odeberg J., 2005; Liu J., 2013; Vagaska B., 2016].

Таблиця 1

Експресія антигенів HLA-A,B,C і HLA-DR нейроклітинами фетального мозку людини залежно від терміну гестації (% позитивних клітин)

№	Тип клітин	Термін гестації	HLA-A,B,C <sup>+</sup>	HLA-DR <sup>+</sup>
1	НСК/НПК фетального мозку	5-7 тижнів (n = 5)	12,90 ± 2,30 (8,30 - 16,30)* <sub>1</sub> * <sub>2</sub>	12,23 ± 0,97 (10,30 - 13,30)
2		8-9 тижнів (n = 5)	18,53 ± 3,68 (12,40 - 25,90)* <sub>1</sub> * <sub>3</sub>	23,17 ± 7,07 (14,60 - 37,30)* <sub>4</sub>
3	Клітини НЦ (регіонарні НСК/НПК зрілого мозку)	дорослі (n = 5)	5,05 ± 1,51 (0 - 15,03)* <sub>2</sub> * <sub>3</sub>	10,72 ± 2,69 (0 - 22,73)* <sub>4</sub>

Примітка: \*- відмінності статистично значущі між групами,  $p < 0,05$ , U-критерій Манна-Уїтні.

При культивуванні нейрогенних клітин у середовищі DMEM за наявності ретинола ацетату (0,2 мг/мл) кількість HLA-A,B,C<sup>+</sup> та HLA-DR<sup>+</sup>-клітин зменшується до 10-14-ї доби ( $p = 0,008$ ,  $p = 0,04$ , парний тест Вілкоксона; табл.2); експресія мРНК генів HLA суттєво не змінюється ( $p = 0,07$ , критерій  $\chi^2$ ). За впливу EGF (20 нг/мл) кількість HLA-A,B,C<sup>+</sup>-клітин після зменшення на 10-у добу відновлюється до 14-ї доби; HLA-DR<sup>+</sup> – зростає в цей термін удвічі ( $p = 0,03$ , парний тест Вілкоксона). За впливу FGF (10 нг/мл) досліджувані показники не мають статистично значущої різниці (табл.2). Додавання у культивацийне середовище EGF і FGF не спричиняє змін експресії мРНК генів HLA, а також мРНК СІТА – МНС-специфічного активатора транскрипції. При культивуванні у середовищі DMEM нейроклітин НЦ відносна кількість HLA-A,B,C<sup>+</sup>- і HLA-DR<sup>+</sup>-клітин має тенденцію до зменшення з 10-ї по 20-у добу спостереження ( $p = 0,47$ ,  $p = 0,27$ , парний тест Вілкоксона), впливу на експресію мРНК генів HLA не виявлено ( $p = 0,39$ , критерій  $\chi^2$ ). Отже, культивування впродовж 14 діб нейроклітин фетального мозку людини 5-9-го тижнів гестації за наявності ретинола ацетату сприяє зменшенню абсолютної і відносної кількості клітин, що експресують антигени HLA I і II класу, тоді як за наявності факторів росту кількість цих клітин залишається сталою (FGF) або збільшується вдвічі (EGF).

Вплив культивування на експресію антигенів HLA-A,B,C та HLA-DR  
нейроклітинами людини 5-9-го тижнів гестації

№	Склад середовища	Кількість позитивних клітин	Доба спостереження				
			0-а	7-8-а	9-10-а	12-14-а	
1	DMEM + ретинола ацетат (n=6)	відносна, %	15,72 ± 1,44	15,67 ± 2,63	9,10 ± 1,40	6,70 ± 0,80 *	
		абсолютна, x10 <sup>6</sup>	1,00 ± 0,25	0,31 ± 0,10 *	0,11 ± 0,02 *	0,23 ± 0,02 *	
	HLA-A,B,C <sup>+</sup>	DMEM + EGF (n = 6)	відносна, %	18,76 ± 3,57	23,10 ± 2,43	10,30 ± 1,10	18,20 ± 0,82
			абсолютна, x10 <sup>6</sup>	0,65 ± 0,09	0,19 ± 0,04 *	0,10 ± 0,02 *	0,46 ± 0,02
		DMEM + FGF (n = 6)	відносна, %	18,76 ± 3,57	25,40 ± 2,15	19,80 ± 1,54	20,50 ± 1,50
			абсолютна, x10 <sup>6</sup>	0,65 ± 0,09	0,24 ± 0,09 *	0,50 ± 0,09	0,51 ± 0,10
2	DMEM + ретинола ацетат (n=6)	відносна, %	17,70 ± 2,29	15,50 ± 2,41	13,40 ± 1,10	3,60 ± 0,30 *#	
		абсолютна, x10 <sup>6</sup>	1,11 ± 0,25	0,30 ± 0,10	0,17 ± 0,02 *	0,12 ± 0,02 *	
	HLA-DR <sup>+</sup>	DMEM + EGF (n = 6)	відносна, %	21,23 ± 3,28	17,60 ± 2,30	22,31 ± 3,03	48,00 ± 0,30 *#
			абсолютна, x10 <sup>6</sup>	0,55 ± 0,18	0,14 ± 0,03	0,50 ± 0,16	1,20 ± 0,02 *
		DMEM + FGF (n = 6)	відносна, %	21,23 ± 3,28	17,20 ± 2,10	17,35 ± 1,65	18,15 ± 0,31
			абсолютна, x10 <sup>6</sup>	0,55 ± 0,18	0,17 ± 0,03	0,36 ± 0,12	0,40 ± 0,10

Примітка: відмінності статистично значущі між групами (\*) та порівняно з показниками 0-ї доби (#),  $p < 0,05$ , парний тест Вілкоксона.

За впливу IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  відносна і абсолютна кількість нейроклітин, які експресують антигени HLA-A,B,C та HLA-DR, після зменшення на 7-8-у добу культивування зростає до 12-14-ї доби, але не досягає початкового рівня ( $p < 0,05$ , парний тест Вілкоксона; табл.3). Додавання у культиваційне середовище IFN- $\alpha$  та, більшою мірою, IFN- $\gamma$  сприяє появі або зростанню експресії мРНК HLA-DRA1 на 7-12-у добу культивування ( $p = 0,39$ , критерій  $\chi^2$ ; рис.2). Отримані результати відповідають відомим даним щодо можливості індукції МНС-молекул на нейроклітинах всіх типів після дії IFN- $\gamma$  [Johansson S., 2008; Preynat-Seauve O., 2009; Laguna Goya R., 2011; Vagaska B., 2016] та більш сильної їх індукції у диференційованих клітинах, ніж у недиференційованих (НСК/НПК) [Drukker M., 2006], чим, ймовірно, пояснюється дещо нижчий від очікуваного вплив IFN- $\gamma$  на нейроклітини фетального мозку в умовах культивування.

Вплив IFN- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  на експресію антигенів HLA-A,B,C та HLA-DR нейроклітинами людини 5-9-го тижнів гестації

№	Склад середовища	Кількість позитивних клітин	Доба спостереження			
			0-а	7-8-а	9-10-а	12-14-а
1	DMEM + IFN- $\alpha$ (n=6)	відносна, %	12,67 $\pm$ 2,32	1,40 $\pm$ 0,37 *	3,40 $\pm$ 0,65 *	5,60 $\pm$ 0,07 *#
		абсолютна, $\times 10^6$	1,24 $\pm$ 0,50	0,02 $\pm$ 0,01 *	0,18 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,03 #
	DMEM + IFN- $\gamma$ (n = 6)	відносна, %	12,67 $\pm$ 2,32	2,65 $\pm$ 0,87 *	2,80 $\pm$ 0,90 *	4,20 $\pm$ 0,09 *
		абсолютна, $\times 10^6$	1,24 $\pm$ 0,40	0,05 $\pm$ 0,01 *	0,20 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,09
2	DMEM + IFN- $\alpha$ (n=6)	відносна, %	14,17 $\pm$ 1,93	2,60 $\pm$ 0,68	2,50 $\pm$ 0,36 *	2,70 $\pm$ 0,35 *
		абсолютна, $\times 10^6$	1,32 $\pm$ 0,39	0,03 $\pm$ 0,01 *	0,05 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02
	DMEM + IFN- $\gamma$ (n = 6)	відносна, %	14,17 $\pm$ 1,93	1,55 $\pm$ 0,48 *	2,05 $\pm$ 0,57 *	2,90 $\pm$ 0,08 *
		абсолютна, $\times 10^6$	1,32 $\pm$ 0,39	0,03 $\pm$ 0,01 *	0,13 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,09

Примітка: відмінності статистично значущі, порівняно з показниками 0-ї доби (\*) та 7-8-ї доби (#),  $p < 0,05$ , парний тест Вілкоксона.

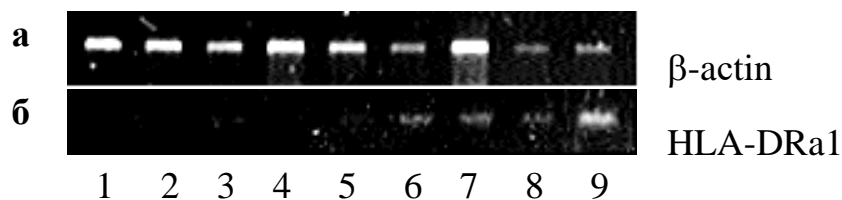


Рис.2. Рівень експресії мРНК гену HLA-DRa1 нейроклітинами людини 5-9-го тижнів гестації упродовж культивування. Електрофореграми ампліконів  $\beta$ -actin (220 п.н., а) та HLA-DRa1 (272 п.н., б); 1 – 0-а доба; 2 – 7-а доба (DMEM + ретинол); 3 – 7-а доба (DMEM + IFN- $\alpha$ , 70 пкг/мл); 4 – 7-а доба (DMEM + IFN- $\gamma$ , 300 пкг/мл); 5 – 12-а доба (DMEM + ретинол); 6 – 12-а доба (DMEM + IFN- $\alpha$ , 70 пкг/мл); 7 – 12-а доба (DMEM + IFN- $\gamma$ , 300 пкг/мл); 8 – 0-а доба; 9 – 8-а доба, (DMEM + IFN- $\gamma$ , 300 пкг/мл).

Таким чином, культивування нейрогенних клітин мозку *in vitro* у присутності ретинола ацетату супроводжується помірним зниженням експресії молекул HLA.

**Імуногенність фетальних нейрогенних клітин при введенні в організм.** Здатність фетальних нейрогенних клітин викликати розвиток імунних реакцій оцінювали при внутрішньоочеревинному (в/о) та внутрішньомозковому (в/м) введенні тваринам-реципієнтам у порівнянні з лімфоцитами та нейроклітинами дорослих тварин.

Встановлено, що алоспецифічна ЦА імунітетів мишей-реципієнтів C57BL/6 усіх дослідних груп зростає на 6-у добу у 1,5-2 рази після в/о введення клітин ( $p \leq 0,0007$ ; рис.3,а) та з 6-ї по 12-у добу в 1,4-1,8 рази після в/м їх введення ( $p \leq 0,02$ ; рис.3,б), знижуючись у наступні строки спостереження ( $p \leq 0,05$ ). У реципієнтів фетальних НПК алоспецифічна ЦА імунітетів значуще нижча за показник реципієнтів алогенних лімфоцитів дорослих донорів (за в/о введення на 6-у, 18-у, 37-у добу ( $p \leq 0,02$ ) та за в/м введення на 12-37-у добу ( $p = 0,02$ ) і в останній строк наближається до контрольного рівня. Алоспецифічна ЦА сироватки периферичної крові реципієнтів всіх груп зростає втричі після в/о введення клітин на 6-12-у добу ( $p \leq 0,02$ , рис.3,в), і знижується з 18-ї до 37-ї доби ( $p \leq 0,03$ ), не досягаючи норми ( $p \leq 0,02$ ). Після в/м введення клітин цей показник зростає вдвічі на 12-у добу ( $p \leq 0,005$ ), надалі знижуючись на 18-37-у добу (рис.3,г). У реципієнтів фетальних НПК ЦА алоантитіл нижча за показник реципієнтів лімфоцитів (на 6-у, 18-у добу після в/о введення ( $p \leq 0,01$ ) та на 18-у, 37-у добу після в/м введення ( $p \leq 0,01$ ).

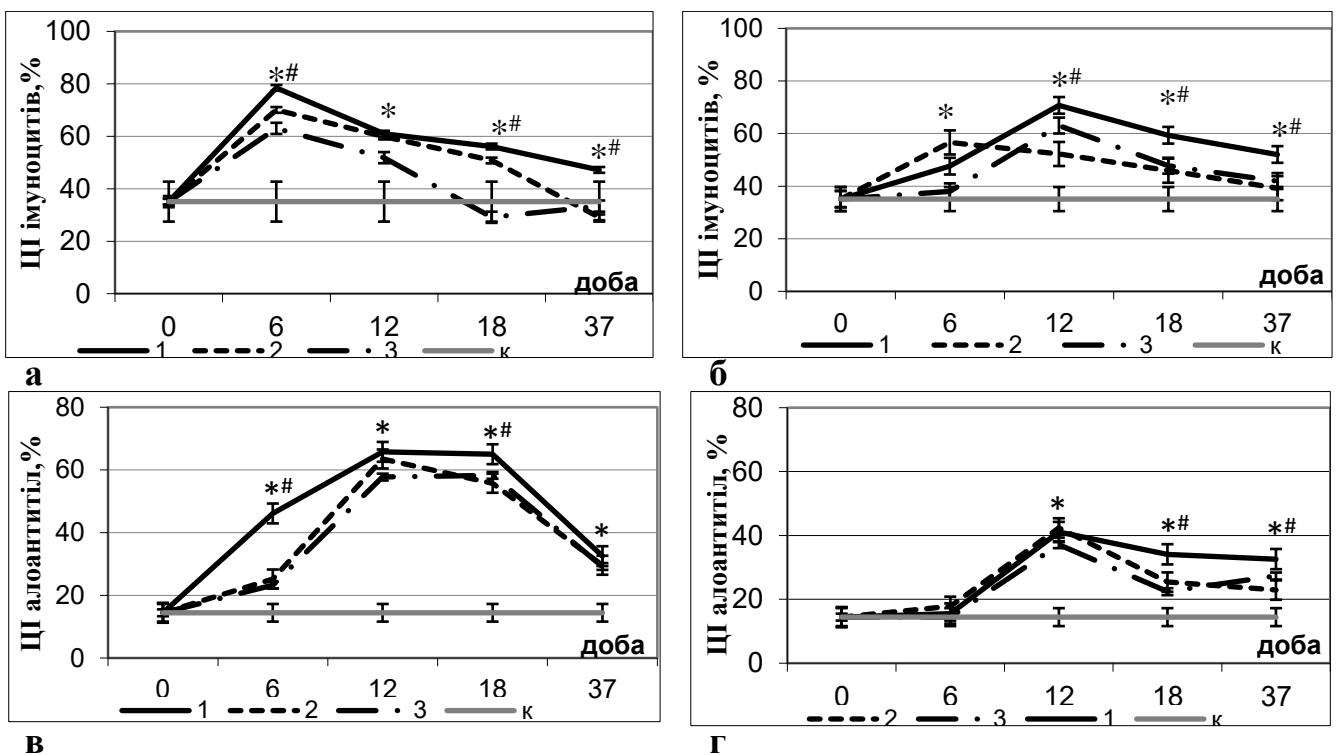


Рис.3. Показники цитотоксичних алоспецифічних імунних реакцій мишей-реципієнтів C57Bl/6 в динаміці після внутрішньоочеревинного (а, в) та внутрішньомозкового (б, г) введення алогенних клітин мишей-донорів СВА: а, б – цитотоксична активність лімфоцитів лімфовузлів мишей-реципієнтів C57Bl/6 стосовно лімфоцитів лімфовузлів мишей-донорів СВА; в, г – цитотоксична активність сироватки периферичної крові мишей-реципієнтів C57Bl/6 стосовно лімфоцитів лімфовузлів мишей-донорів СВА; ЦІ – цитотоксичний індекс (%); 1 – введення лімфоцитів СВА донорів; 2 – введення фетальних нейроклітин E13-15 СВА донорів; 3 – введення нейроклітин СВА донорів,  $n = 24$  для кожної групи; к – контроль C57Bl/6 (інтактні,  $n = 12$ ); \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем, # –  $p < 0,05$  між групами (t-критерій Стюдента).

У тварин із в/о введенням фетальних НПК показники цитотоксичних алоспецифічних імунних реакцій статистично значуще вищі, ніж у тварин з в/м введенням

клітин (алоспецифічна ЦА імуноцитів – на 6-у, 18-у добу ( $p < 0,05$ ; рис.4,а); Ці алоантитіл – на 12-у, 18-у добу ( $p \leq 0,04$ ; рис.4,в). Циклоспорин А (5 мг/кг на 0-у, 3-ю, 6-у добу) знижує ЦА імуноцитів до норми у тварин після в/о введення фетальних НПК з 12-ї по 37-у добу ( $p = 0,03$ ; рис.4,б) та після в/м введення – на 37-у добу ( $p = 0,07$ ). ЦА алоантитіл на 37-у добу залишається підвищеною у тварин обох груп ( $p \leq 0,05$ ); циклоспорин А знижує цей показник до норми до 37-ї доби у тварин із в/о введенням фетальних НПК ( $p = 0,04$ ; рис.4,г), суттєво не впливаючи на показник тварин із в/м їх введенням.

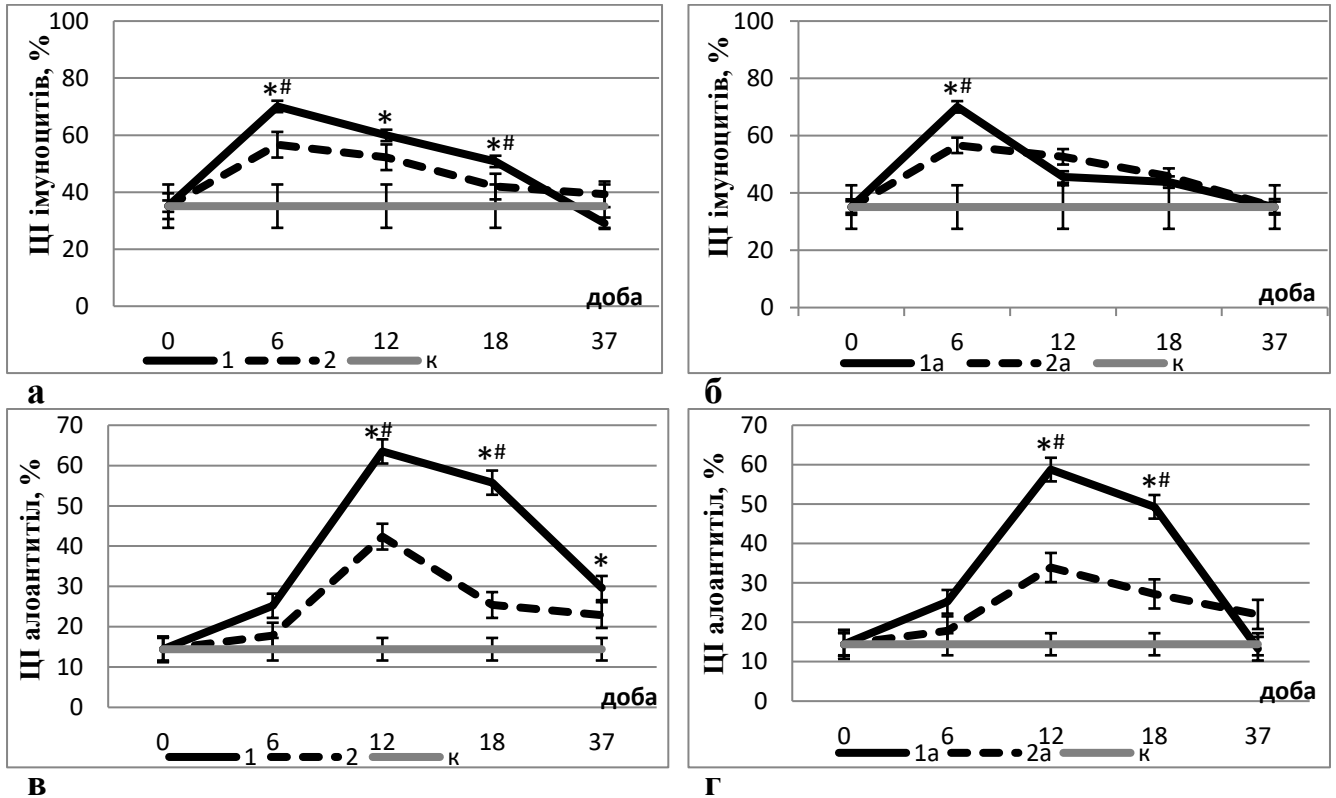


Рис.4. Показники цитотоксичних алоспецифічних імунних реакцій мишей-реципієнтів C57Bl/6 в динаміці після введення алогенних фетальних нейроклітин СВА донорів: а, б – цитотоксична активність лімфоцитів лімфовузлів мишей-реципієнтів C57Bl/6 стосовно лімфоцитів лімфовузлів мишей-донорів СВА; в, г – цитотоксична активність сироватки периферичної крові мишей-реципієнтів C57Bl/6 стосовно лімфоцитів лімфовузлів мишей-донорів СВА; Ці – цитотоксичний індекс (%); 1 – внутрішньоочеревинне введення клітин ( $n = 24$ ); 1а - внутрішньоочеревинне введення клітин + імуносупресія циклоспорином А ( $n = 18$ ); 2 – внутрішньомозкове введення клітин ( $n = 24$ ); 2а – внутрішньомозкове введення клітин + імуносупресія циклоспорином А ( $n = 18$ ); к – контроль C57BL/6 (інтактні,  $n = 12$ ); \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем, # –  $p < 0,05$  між групами (t-критерій Стюдента).

Отже, фетальні НПК (E13-15) розпізнаються і викликають алоспецифічну клітинну та гуморальну імунну відповідь в алогенній системі *in vivo*, інтенсивність якої нижча за відповідь на алогенні імуноцити, що засвідчує експресію антигенів МНС фетальними НПК на більш низькому, але достатньому для генерації алоцитотоксичної імунної відповіді рівні, та відповідає даним [Preynat-Seauve O., 2009; Laguna Goya R., 2011; Phillips L.K., 2013]. Розвиток алоцитотоксичних реакцій після в/м введення фетальних НПК (E13-15) розширює уявлення щодо індукції НСК/НПК ефекторної фази імунної відповіді при

трансплантації у мозок [Wang X.J., 2007; Chen Z., 2008; Ideguchi M., 2008] та підтверджує умовність концепції «імунопривілейованості» головного мозку [Aspelund A., 2015; Bucchieri F., 2015; Louveau A., 2015; Hoornaert C.J., 2017; Shimada A., 2017].

Поряд з імунною відповіддю на алоантигени МНС у реципієнтів алогенних фетальних НПК виявлено відповідь на нейроспецифічні антигени. Рівень антитіл до ОБМ (рис.5,а) у тварин із в/о введенням алогенних НПК зростає на 18-37-у добу ( $p = 0,05$ ), з в/м введенням – з 6-ї по 12-у добу ( $p = 0,0003$ ,  $p = 0,03$ ), перевищуючи показник тварин з в/о введенням алогенних НПК ( $p = 0,02$ ,  $p = 0,009$ ); та після зниження на 18-у добу зростає до 37-ї доби ( $p = 0,05$ ). Циклоспорин А знижує ( $p < 0,05$ ) рівень антитіл до ОБМ на 18-37-у добу в обох групах тварин (рис.5,б).

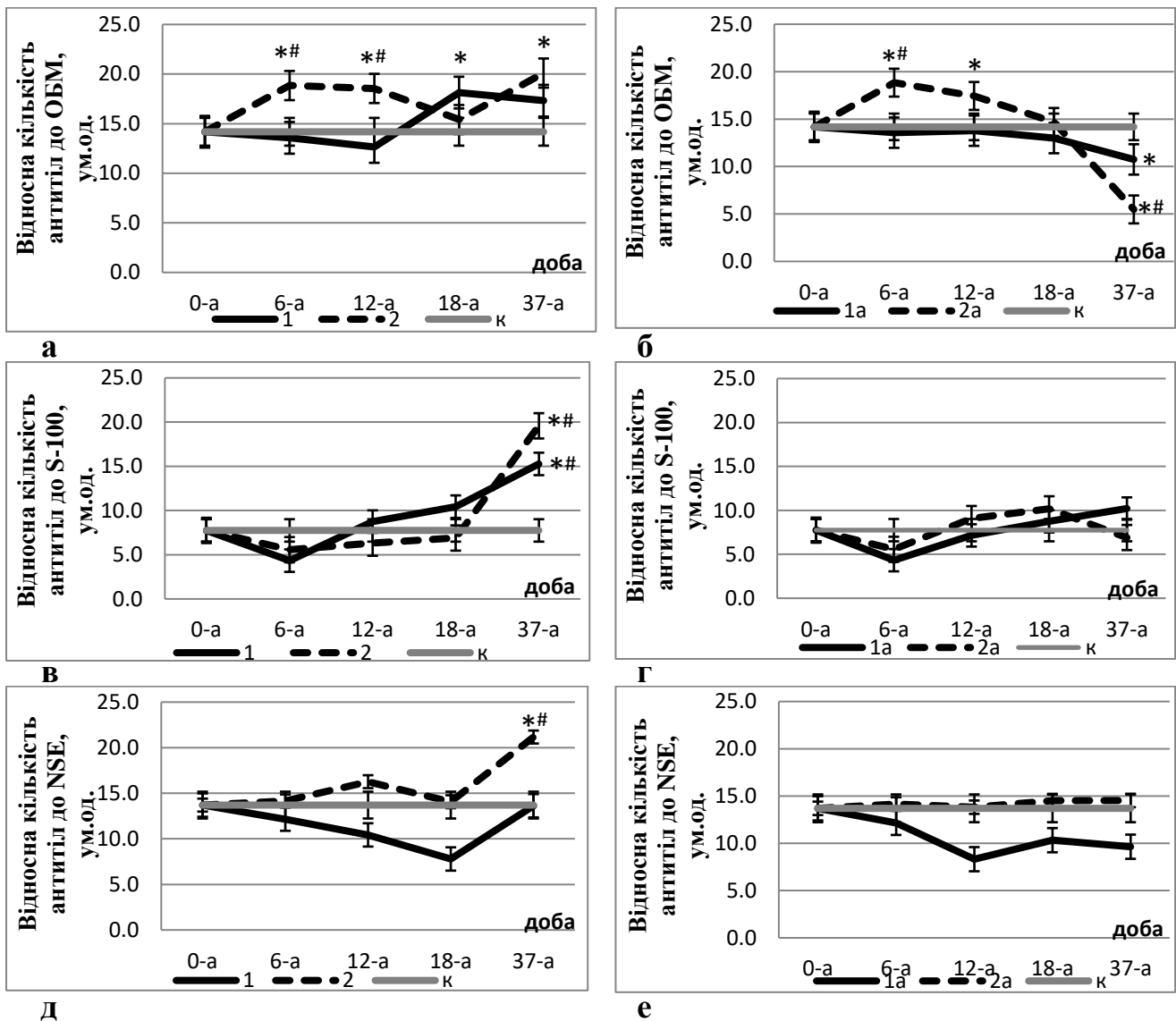
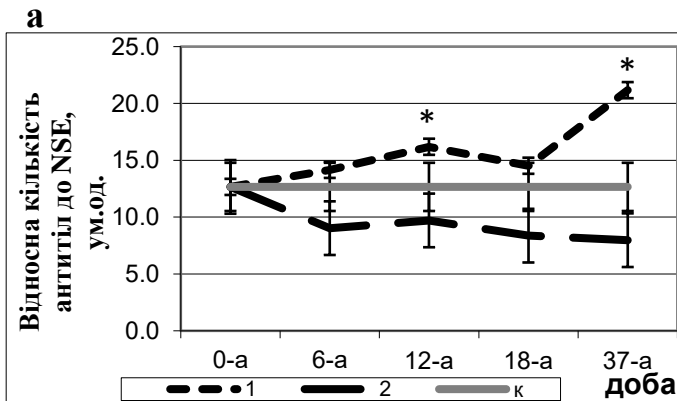
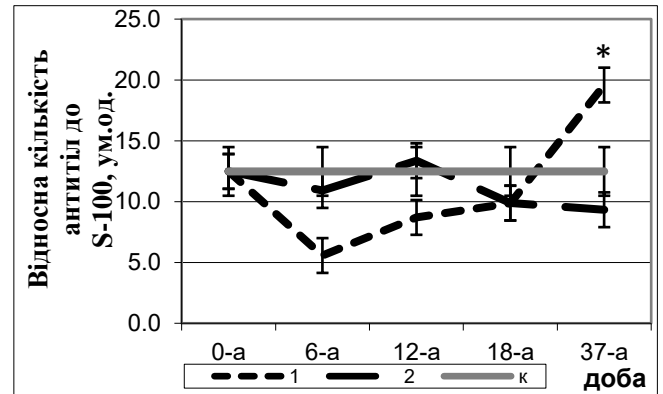
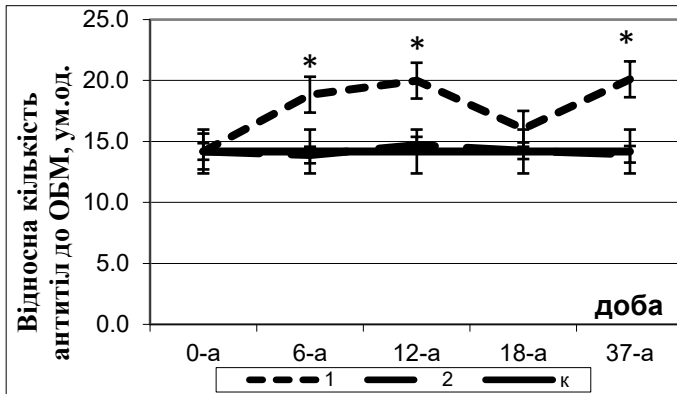


Рис.5. Вміст антитіл до нейроспецифічних білків ОБМ (а, б), S-100 (в, г) та NSE (д, е) у сироватках периферичної крові мишей-реципієнтів C57Bl/6 при введенні алогенних фетальних нейроклітин СВА донорів; 1 – внутрішньоочеревинне введення клітин ( $n = 24$ ); 1а – внутрішньоочеревинне введення клітин + імуносупресія циклоспорином А ( $n = 18$ ); 2 – внутрішньомозкове введення клітин ( $n = 24$ ); 2а – внутрішньомозкове введення клітин + імуносупресія циклоспорином А ( $n = 18$ ); к – контроль C57BL/6 (інтактні,  $n = 12$ ).

\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем, # -  $p < 0,05$  між групами (t-критерій Стьюдента).

Рівень антитіл до S-100 у тварин із в/о та в/м введенням алогенних фетальних НПК після зниження на 6-у добу ( $p = 0,01$ ) значуще підвищується до 37-ї доби ( $p = 0,02$ ; рис.5,в). Рівень антитіл до NSE у тварин із в/о введенням алогенних фетальних НПК знижується на 12-18-у добу ( $p = 0,01$ ) та нормалізується до 37-ї доби ( $p = 0,03$ ; рис.5,д); у тварин з в/м введенням клітин – зростає на 12-у ( $p = 0,04$ ) і 37-у добу ( $p = 0,03$ ), перевищуючи показник тварин з в/о введенням НПК ( $p \leq 0,04$ ). Циклоспорин А знижує рівень антитіл до S-100 та NSE на 37-у добу у тварин обох груп ( $p < 0,05$ ; рис.5,г,е). У тварин-реципієнтів сингенних фетальних НПК за в/м їх введення не виявлено антитіл до ОБМ, S-100, NSE ( $p \leq 0,04$ , порівняно з показниками реципієнтів алогенних НПК; рис.6,а,б,в).



в

б

Рис.6. Вміст антитіл до нейробілків ОБМ (а), S-100 (б), NSE (в) у сироватках периферичної крові мишей-реципієнтів C57Bl/6 при внутрішньомозковому введенні алогенних (1,  $n = 24$ ) та сингенних (2,  $n = 24$ ) фетальних нейроклітин; к – контроль (інтактні,  $n = 12$ ). \* –  $p < 0,05$  між групами (t-критерій Стьюдента).

Відмінність динаміки ало- та нейроспецифічної відповіді у мишей-реципієнтів алогенних фетальних НПК пов'язана з тим, що в результаті здійснення ефекторної функції алоцитотоксичних лімфоцитів та антитіл частина фетальних клітин гине, вивільняючи НСБ, які зв'язуються циркулюючими природними аутоантитілами, відтермінуючи зростання титрів нейроантитіл до 18-37-ї доби, а у ранні строки знижуючи їх рівні нижче фізіологічного. Встановлені прямі кореляційні зв'язки – між ЦА імуноцитів та ЦА алоантитіл (коефіцієнт кореляції Спірмена  $r = 0,42$ ,  $p = 0,03$ ) а також рівнем антитіл до ОБМ ( $r = 0,44$ ,  $p = 0,01$ ), між рівнями антитіл до ОБМ та NSE ( $r = 0,61$ ,  $p = 0,009$ ) та обернені – між рівнем антитіл до NSE і ЦА алоантитіл ( $r = -0,51$ ,  $p = 0,007$ ), ЦА імуноцитів ( $r = -0,38$ ,  $p = 0,06$ ) підтверджують наступний механізм розвитку нейроспецифічної імунної відповіді у тварин-реципієнтів фетальних НПК: контакт імуноцитів з НПК → розпізнавання антигенів МНС → активація клітин імунної системи (природних кілерів (ПК), ЦТЛ, В-лімфоцитів) → генерація цитотоксичних клонів ПК і ЦТЛ і продукція алоцитотоксичних антитіл → імунолізис частини НПК → демаскування нейроспецифічних антигенів, вивільнення НСБ → розпізнавання НСБ імуноцитами (Th2-, В-лімфоцити) → генерація

нейроспецифічних антитіл → антитілозалежний лізис клітин-мішеней (власних клітин ЦНС реципієнта) → масоване вивільнення НСБ → активація антигенспецифічних клонів лімфоцитів (Т-, В-лімфоцити) → підтримання продукції нейроспецифічних антитіл. Таким чином, поряд з імунною відповіддю на антигени МНС, експресовані на фетальних НПК, розвивається довготривала аутоімунна відповідь на нейроантигени. Застосування циклоспорину А в дозі 5 мг/кг трикратно зменшує прояви імунних реакцій алогенного та нейроаутоімунного спрямування, що відповідає даним Ideguchi M. et al. (2008).

**Взаємозв'язок імунних реакцій та структурних змін головного мозку мишей після внутрішньомозкового введення фетальних нейроклітин.** Морфологічне дослідження зрізів мозку мишей-реципієнтів сингенних і алогенних фетальних НПК засвідчує збереження введених клітин до 12-18-ї доби експерименту (рис.7,а,б) та початкове нейрональне диференціювання алогенних НПК, а у реципієнтів з імуносупресією циклоспорином А – фенотипове диференціювання різного ступеня, що відповідає даним інших авторів [Lepore A.C. et al., 2006; Muraoka K. et al., 2006; Ideguchi M. et al., 2008; Chen Z. et al., 2011]. У субпендимарній зоні бічних шлуночків відзначена фокальна проліферація гліоцитів на 12-18-у добу після в/м введення алогенних фетальних НПК.

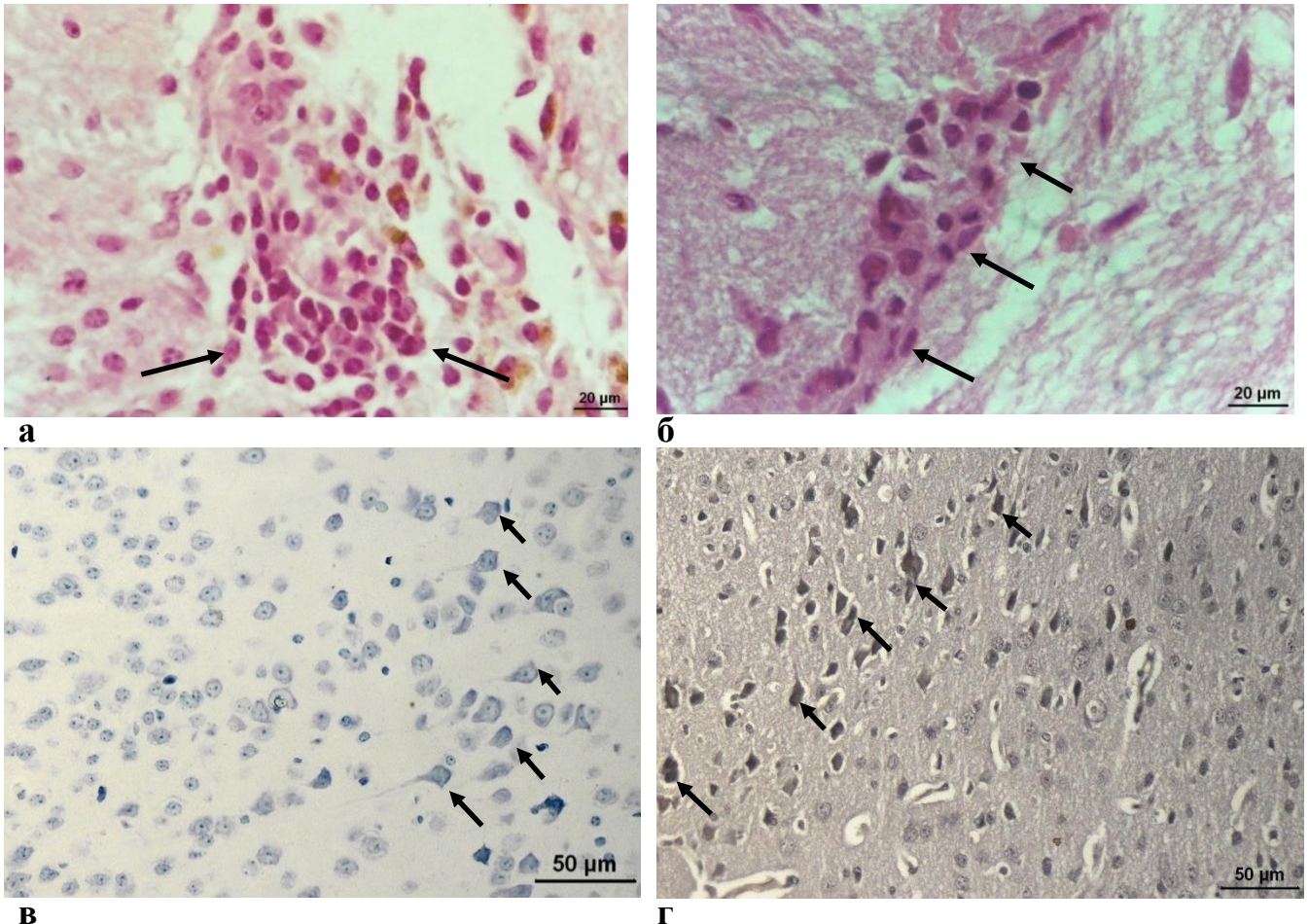


Рис.7. Гістопрепарати тканин головного мозку мишей-реципієнтів C57BL/6 після внутрішньомозкового введення фетальних нейрогенних клітин. Забарвлення гематоксилін-еозином (а,б), тіоніном (в), гематоксилін-пікрофуксином (г). а - сингенні нейроклітини у зоні введення, 12-а доба; б – алогенні нейроклітини у зоні введення, 18-а доба; в, г – дистрофічно змінені нейрони мишей-реципієнтів сингенних (в) та алогенних (г) нейроклітин, 12-а доба (показано стрілками).

Морфометричне дослідження неокортексу мозку мишей-реципієнтів доводить розвиток деструктивних процесів (дистрофічних змін нейронів – хроматоліз, набряк ядер, вакуолізація цитоплазми (рис.7,в,г), змін гліоцитів, перичелюлярного та периваскулярного набряку, що відображаються у зниженні чисельної щільності (ЧЩ) незмінених та збільшенні ЧЩ дистрофічно змінених нейронів і зростанні ЧЩ гліоцитів), кількість яких зменшується повільніше після в/м введення алогенних НПК (до 37-ї доби), ніж сингенних (до 18-ї доби). ЧЩ незмінених нейронів неокортексу у реципієнтів сингенних НПК перевищує показник реципієнтів алогенних НПК ( $p \leq 0,0003$ ); водночас ЧЩ дистрофічно змінених нейронів шару кори ( $p \leq 0,0007$ ) та ЧЩ гліоцитів ( $p = 0,000001$ ) у реципієнтів сингенних клітин нижчі за показники реципієнтів алогенних клітин. Імуносупресія циклоспорином А сповільнює зниження ЧЩ незмінених нейронів ( $p \leq 0,04$ ) та гальмує нарощування ЧЩ дистрофічно змінених нейронів і гліального індексу ( $p \leq 0,04$ ; U-критерій Манна–Уїтні) у неокортексі мишей-реципієнтів алогенних НПК.

Морфологічні зміни в тканині мозку реципієнтів алогенних НПК співвідносяться з динамікою системних імунних реакцій. Встановлено прямі кореляційні зв'язки між ЦІ імуніцитів та ЧЩ гліоцитів (коефіцієнт кореляції Спірмена  $r = 0,42$ ,  $p = 0,04$ ), гліальним індексом ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,02$ ), ЧЩ незмінених нейронів шару кори ( $r = 0,47$ ,  $p = 0,007$ ), між ЦА алоантитіл та загальною ЧЩ нейронів ( $r = 0,64$ ,  $p = 0,0003$ ) і ЧЩ дистрофічно змінених нейронів шару кори ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,07$ ) та обернені кореляційні зв'язки між ЦА імуніцитів та ЧЩ дистрофічно змінених нейронів ( $r = - 0,47$ ,  $p = 0,003$ ), площею перерізу ядра ( $S_{я}$ ) нейронів ( $r = - 0,47$ ,  $p = 0,003$ ), між ЦІ алоантитіл та  $S_{я}$  нейронів ( $r = - 0,44$ ,  $p = 0,02$ ). Прямий кореляційний зв'язок кількості антитіл до ОБМ з ЧЩ дистрофічно змінених нейронів шару кори ( $r = 0,37$ ,  $p = 0,05$ ) та обернені кореляційні зв'язки між кількістю антитіл до S-100 та розмірами ядра гліоцитів ( $r = - 0,39$ ,  $p = 0,05$ ), між рівнем антитіл до NSE та  $S_{я}$  нейронів ( $r = - 0,46$ ,  $p = 0,02$ ) підтверджують вищенаведений механізм розгортання нейроімунних реакцій після внутрішньомозкової імплантації алогенних фетальних нейрогенних клітин.

Таким чином, розвиток алоспецифічних та нейроспецифічних імунних реакцій у відповідь на внутрішньомозкове введення фетальних нейрогенних клітин асоційований з розвитком дегенеративних змін нервової тканини.

**Імуномодулювальні властивості кондиційованого середовища нейрогенних клітин (КСНК) фетального мозку.** Оскільки одним із механізмів дії трансплантованих НСК/НПК вважають їх модулювальний вплив через взаємообмін молекулярними сигналами з різними типами клітин мікрооточення за рахунок вивільнення клітинних регуляторів (морфогенів, нейротрофінів, цитокінів, хемокінів), нами досліджено вплив КСНК фетального мозку щура (E12-16) *in vitro* та *in vivo*. В результаті ІФА виявлено, що КСНК щура містить BDNF, TGF- $\beta$ 1, IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-4 (табл.4), що відповідає даним [Klassen H.J. et al., 2003; Chen H.C. et al., 2010; Liu J. et al., 2013; Zhang H. et al., 2015]. За даними електрофорезу (10 % ПААГ) у КСНК ідентифіковано кілька протеїнових фракцій з молекулярною масою 67 кДа, 46 кДа, 37 кДа, 38 кДа, 30 кДа, 25 кДа та 12 кДа (рис.8).

Упродовж 24-год інкубації не виявлено значущого цитотоксичного впливу КСНК на МНПК осіб групи контролю (ЦІ становить 15-17 %); а також впливу на експресію ними диференційних та активаційних антигенів (HLA-A,B,C, HLA-DR, CD-25,-54,-56,-95), кількість апоптичних PI<sup>+</sup> клітин. Натомість за впливу КСНК встановлено зменшення продукції МНПК TNF- $\alpha$  ( $p = 0,05$ ) та зростання – IL-1 $\beta$  ( $p = 0,0028$ ) і IL-10 ( $p = 0,05$ , U-

критерій Манна-Уїтні; рис.9,а), а також тенденцію до позитивної модуляції експресії мРНК TGF- $\beta$ 2 ( $p = 0,007$ ,  $p = 0,03$  за дії 0,02 та 0,10 мг/мл, критерій  $\chi^2$ ; рис.9,б).

Таблиця 4

## Вміст цитокінів у КСНК (E12-16) щура

Цитокіни	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-10	IFN- $\alpha$	TGF- $\beta$ 1	BDNF
Вміст, пг/мг білка	0,0	9,0	16,3	0,00	74,0	120,0	1150,0

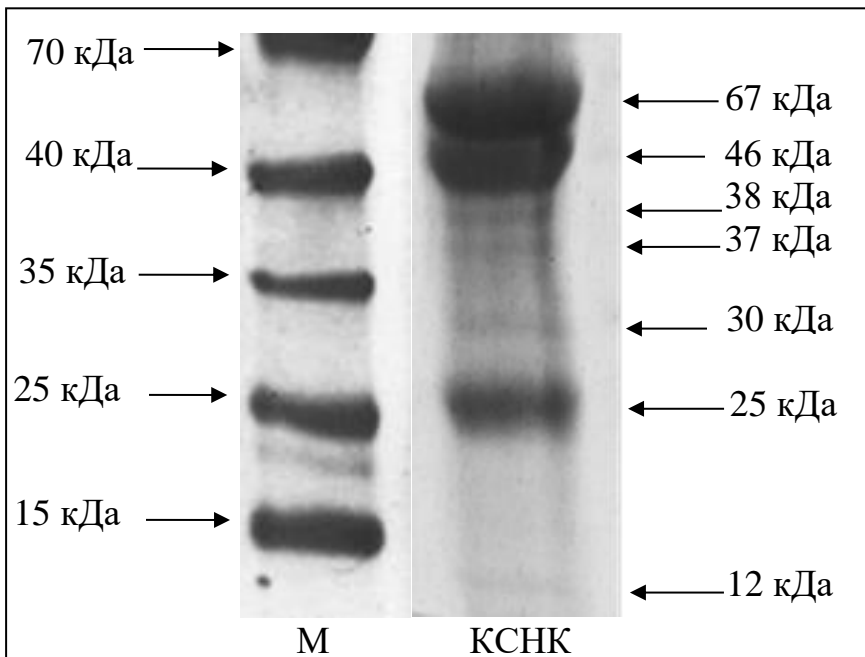


Рис.8. Електрофореграма КСНК мозку щура 12-16 доби гестації у 10 % ПААГ (стрілочками показані складові фракції). М - маркер молекулярних мас.

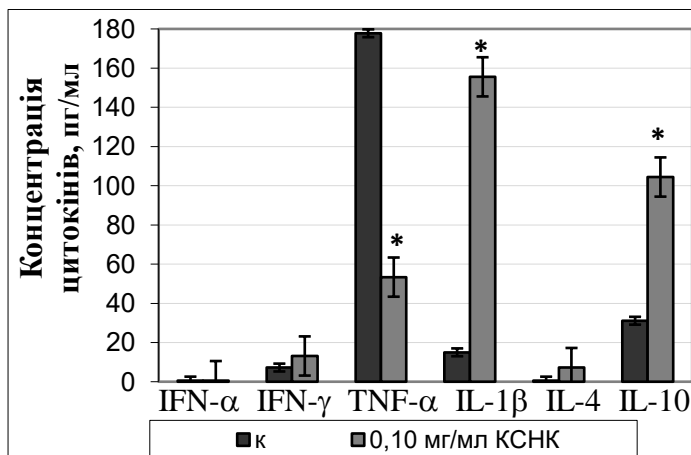


Рис.9. Вплив КСНК щура на синтез (а) та експресію мРНК (б) цитокінів МНПК осіб групи контролю *in vitro* ( $n = 16$ , \* – відмінності статистично значущі у порівнянні з контролем,  $p < 0,05$ ; U-критерій Манна-Уїтні).

КСНК підвищує ЦА імуніцитів несенсбілізованих мишей СВА у МТТ-тесті з ксеногенними клітинами гліоми 101.8 щура за 1-кратного в/о введення (0,88 мг/кг) на 5-у і 10-у добу ( $p = 0,15$ , U-критерій Манна-Уїтні; рис.10,а) та значуще – після 5-кратного введення (сумарно 4,4 мг/кг,  $p = 0,003$ , тест ANOVA Краскела-Уолліса). КСНК підвищує

ЦА імуніцитів щурів стосовно алогенних пухлинних клітин гліоми за 3-кратного в/о введення (сумарно 1 мг/кг,  $p = 0,016$ , U-критерій Манна-Уїтні; рис.10,б).

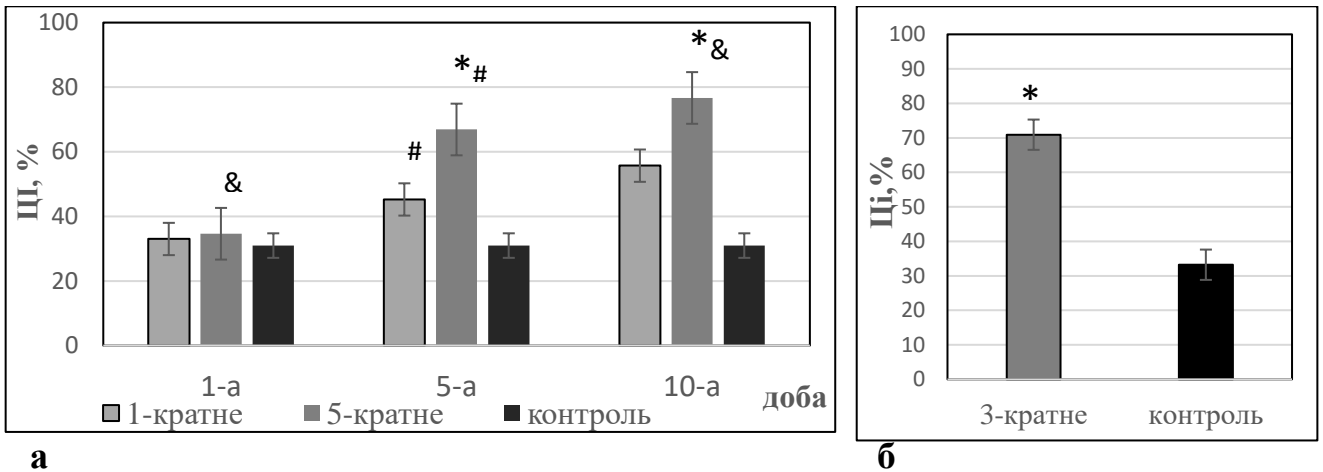


Рис.10. Вплив внутрішньоочеревинного введення КСНК щура на цитотоксичну активність імуніцитів несенсибілізованих мишей (а) та щурів (б) у МТТ-тесті з пухлинними клітинами гліоми 101.8 щура (ЦІ – цитотоксичний індекс (%); відмінності статистично значущі у порівнянні з контролем (\*), показником попереднього строку дослідження (&), показником за 1-кратного введення КСНК (#),  $p \leq 0,03$ , U-критерій Манна-Уїтні).

Таким чином, КСНК в умовах *in vitro* та *in vivo* чинить модулювальний вплив на функції несенсибілізованих імуніцитів: посилює експресію низки цитокінів та цитотоксичну активність проти алогенних та ксеногенних пухлинних клітин у дозозалежний спосіб.

**Вплив КСНК на пухлинні клітини та МНПК хворих з гліомами головного мозку *in vitro*.** Упродовж 24-год інкубації не виявлено значущого цитотоксичного впливу КСНК на МНПК пацієнтів з гліомами, а також впливу на експресію ними молекул HLA-A, B, C, HLA-DR та активаційних антигенів CD-25, -54, -56. Зафіксовано тенденцію до дозозалежного зростання відносної кількості CD95<sup>+</sup> клітин в культурах МНПК пацієнтів з гліомами за впливу 0,02 ( $p = 0,29$ ) та 0,10 ( $p = 0,049$ , U-критерій Манна-Уїтні) мг/мл КСНК; водночас значущих односпрямованих змін кількості P1<sup>+</sup> клітин не виявлено. За впливу КСНК в супернатантах МНПК пацієнтів з гліомами зменшується вміст TNF- $\alpha$  ( $p = 0,008$ ) та IL-10 ( $p = 0,05$ ; рис.11,а); вміст IFN- $\gamma$  залежить від ступеня злоякісності пухлини: у хворих з гліомами II і III ступеня злоякісності має тенденцію до підвищення, у хворих з гліобластомами – до зниження ( $p \geq 0,05$ ; рис.11,б), що відповідає даним Learn S.A. et al. (2006). Встановлено негативну модуляцію експресії мРНК IFN- $\gamma$  та TGF- $\beta$ 2 МНПК за впливу КСНК ( $p = 0,025$ ,  $p = 0,03$ , критерій  $\chi^2$ ; рис.11,в).

На відміну від МНПК, у короткострокових культурах клітин пухлин хворих з гліомами за впливу КСНК дозозалежно зростає частка зразків з цитотоксичним ефектом (з 56,8 % до 72,9 %;  $p = 0,22$ , точний двосторонній критерій Фішера), ЦІ становить 30 - 34 %. КСНК виявляє тенденцію до позитивної модуляції експресії клітинами гліом мРНК генів HLA-A1a, HLA-DRa1, HLA-DQb1, СІТА ( $p > 0,05$ , критерій  $\chi^2$ ) та до зростання частки HLA-A, B, C<sup>+</sup> і HLA-DR<sup>+</sup>-клітин ( $p > 0,05$ ); у культурах гліобластом збільшується відносна кількість HLA-DR<sup>+</sup>-клітин ( $p = 0,04$ ,  $p = 0,03$  за впливу 0,02 та 0,10 мг/мл КСНК, критерій Вілкоксона). КСНК виявляє тенденцію до підвищення відносної кількості CD25<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>,

CD56<sup>+</sup>, PI<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>-клітин у культурах гліом ( $p > 0,05$ ); у культурах гліобластом за впливу КСНК (0,02, 0,10 мг/мл) зростає відносна кількість CD25<sup>+</sup> ( $p = 0,04$ ), PI<sup>+</sup> ( $p = 0,03$ ) та CD95<sup>+</sup>-клітин ( $p = 0,01$ ,  $p = 0,05$ , U-критерій Манна-Уїтні). За впливу КСНК в клітинах гліобластом зростає продукція IFN- $\alpha$  та TNF- $\alpha$  ( $p = 0,04$ ,  $p = 0,64$ , тест ANOVA Краскела-Уолліса; рис.12,а). КСНК має тенденцію до зниження експресії мРНК TGF- $\beta$ 2 ( $p = 0,68$ ; рис.12,б) та IL-10 у клітинах гліом II ступеня злоякісності ( $p = 0,04$ ,  $p = 0,05$ , критерій  $\chi^2$ ).

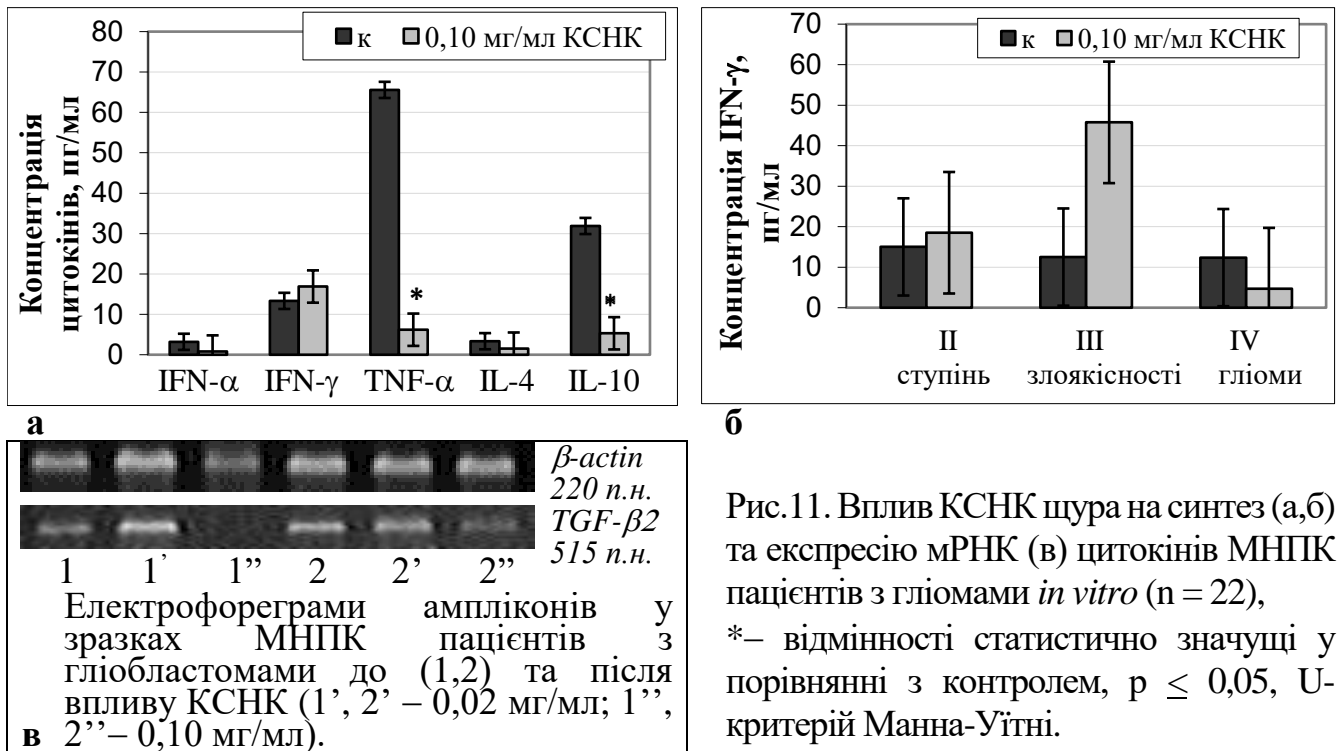


Рис. 11. Вплив КСНК щура на синтез (а,б) та експресію мРНК (в) цитокінів МНПК пацієнтів з гліомами *in vitro* ( $n = 22$ ), \* – відмінності статистично значущі у порівнянні з контролем,  $p \leq 0,05$ , U-критерій Манна-Уїтні.

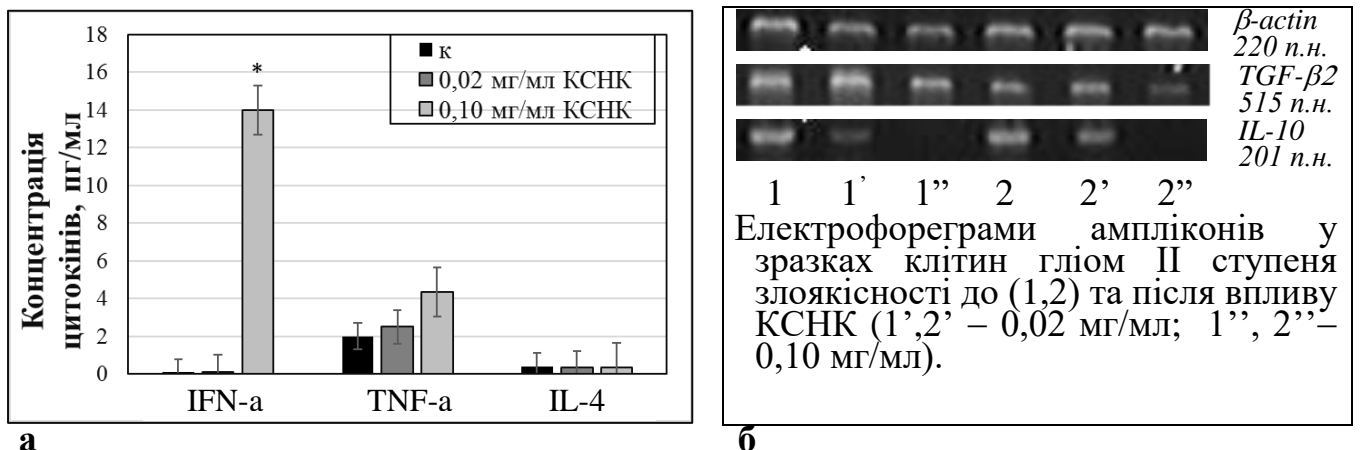


Рис. 12. Вплив КСНК щура на синтез (а) та експресію мРНК (б) цитокінів клітинами пухлин пацієнтів з гліомами головного мозку *in vitro* ( $n = 33$ , \* –  $p < 0,05$ , тест ANOVA Краскела-Уолліса).

У первинних культурах гліом 24-год вплив КСНК індукує дистрофічні та некробіотичні зміни пухлинних клітин та зниження показників мітотичного індексу, що посилюються при подовженні тривалості інкубації до 48 год ( $p \leq 0,05$ ; рис.13).

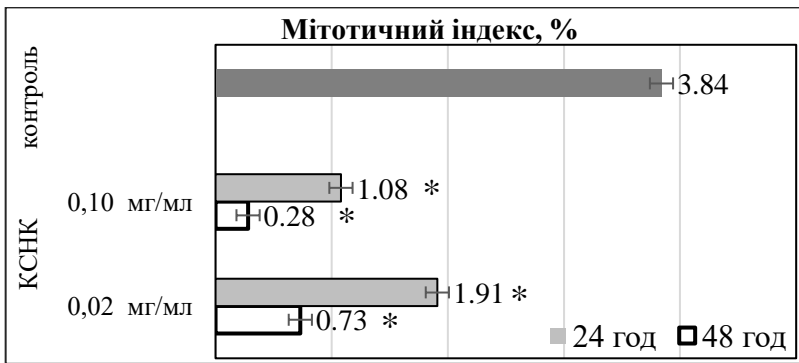


Рис.13. Мітотичний індекс у первинних культурах гліобластом людини за впливу КСНК ( $n = 13$ ; \* - відмінності статистично значущі у порівнянні з контролем,  $p \leq 0,05$ , U-критерій Манна-Уїтні).

Отже, КСНК здатне модулювати функції МНПК пацієнтів з гліомами, а також знижувати проліферативну активність пухлинних клітин з одночасною зміною експресії антигенів гістосумісності та імуносупресивних цитокінів, що може сприяти ефективному розпізнаванню клітин гліом та імунозалежному лізису клітин пухлини ЦТЛ та ПК.

**Вплив КСНК за умов експериментально змодельованого пухлинного процесу головного мозку.** Дослідження впливу КСНК на пухлиноіндукувальну здатність клітин гліоми 101.8 засвідчує, що обробка нативних клітин пухлини КСНК (0,02, 0,10 мг/мл) упродовж 24 год перед перещепленням знижує їх кількість та життєздатність (відповідно на 39 % та 16 %; 52 % та 17 %), що має наслідком збільшення СТЖ та медіани виживаності дослідних щурів ( $p = 0,000001$ , критерій Вілкоксона-Гехана; рис.14,а). У тварин з гліомою, індукованою обробленими КСНК (0,02, 0,10 мг/мл) пухлинними клітинами, ЦА імуніцитів у МТТ-тесті з алогенними клітинами гліоми підвищується на 16 % ( $p = 0,066$ ) та 21 % ( $p = 0,008$ ), порівняно з показником тварин з гліомою, індукованою нативною суспензією клітин (U-критерій Манна-Уїтні, рис.14,б).

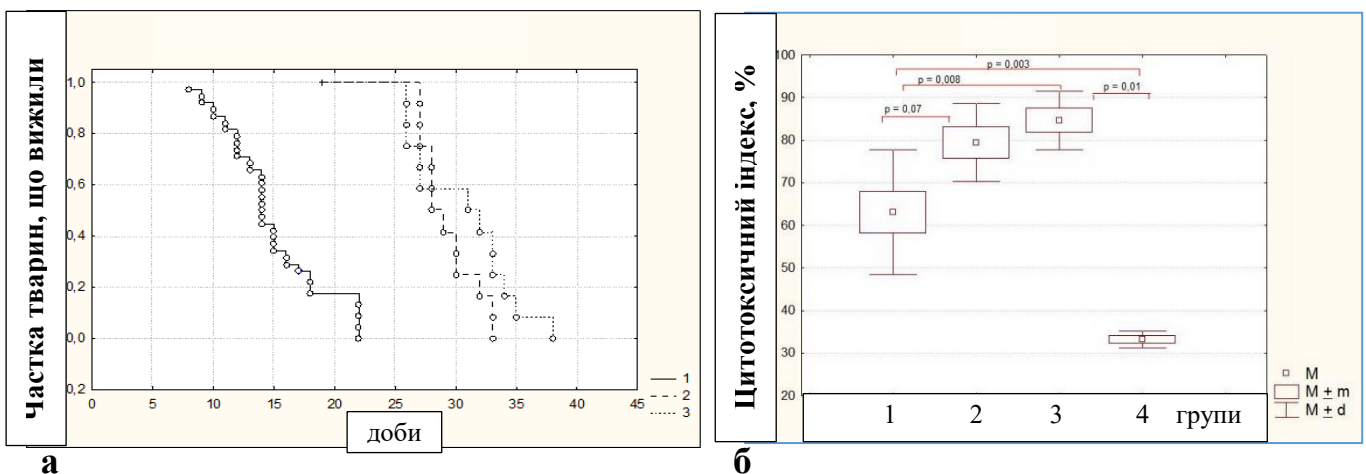


Рис.14. Тривалість життя (а) та цитотоксична активність мононуклеарів селезінки (б) тварин з гліомою, індукованою нативними (1,  $n = 15$ ) та обробленими КСНК клітинами гліоми 101.8 у концентрації 0,02 мг/мл (2,  $n = 15$ ) та 0,10 мг/мл (3,  $n = 15$ ). 4 – інтактні щури ( $n = 6$ ). М – середнє значення; m – стандартна похибка середнього значення; d – середнє квадратичне відхилення від середнього значення.

У тварин з гліомою 101.8, індукованою нативними пухлинними клітинами, і в/о введенням КСНК 3-кратно з 5-ї по 10-у добу після індукції ( $p = 0,0002$ ) та попереднім 3-кратним введенням КСНК за 1 тиждень ( $p = 0,01$ ) та за 1 місяць ( $p = 0,004$ , критерій Вілкоксона-Гехана) до її індукції збільшується СТЖ і медіана виживаності порівняно з

тваринами без введення КСНК (рис.15,а). Режими введення КСНК 3-кратно з 5-ї по 10-ту добу після та за 1 тиждень до індукції пухлини є ефективними у підвищенні ЦА імуніцитів щурів з гліомою (на 11–12 % ( $p = 0,24$ ) та 21–22 % ( $p = 0,009$ ), порівняно з показником тварин з пухлиною без введення КСНК, U-критерій Манна-Уїтні, рис.15,б).

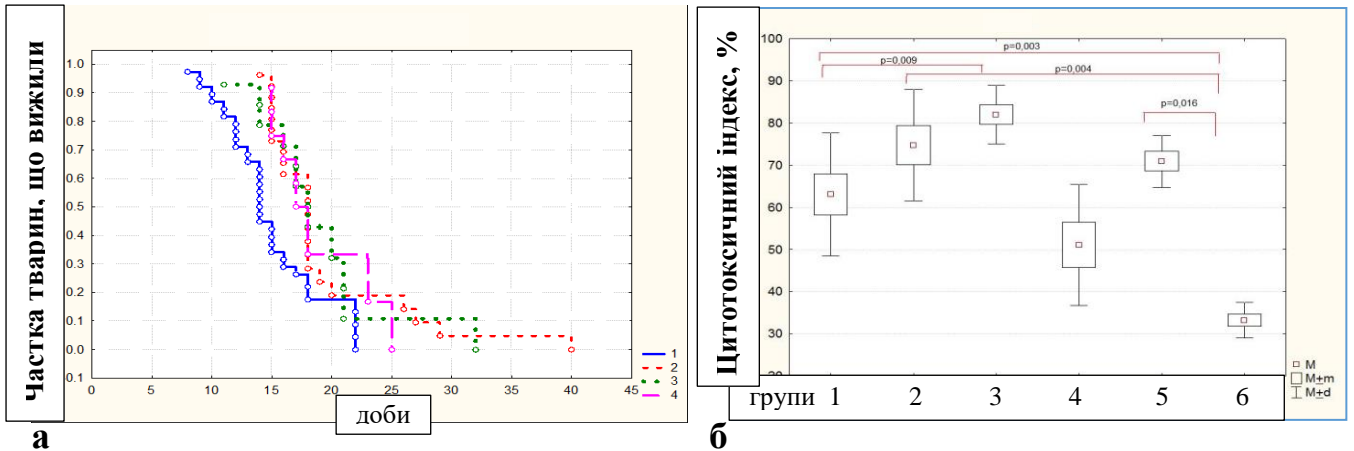


Рис.15. Тривалість життя (а) та цитотоксична активність мононуклеарів селезінки (б) тварин з гліомою, індукованою нативними клітинами 101.8 (1,  $n = 12$ ) та в/о 3-кратним введенням КСНК з 5-ї по 10-ту добу після індукції (2,  $n = 12$ ) та за 1 тиждень (3,  $n = 12$ ) і 1 місяць (4,  $n = 12$ ) до її індукції; 5 – введення КСНК щурам без гліоми ( $n = 6$ ); 6 – інтактні щури ( $n = 6$ ). М – середнє значення; m – стандартна похибка середнього значення; d – середнє квадратичне відхилення від середнього значення.

В/о введення АПВ, модифікованої КСНК (0,10 мг/мл – ефективна доза), щурам з гліомою 101.8 збільшує їх СТЖ і медіану виживаності ( $p = 0,0002$ , критерій Вілкоксона-Гехана; рис.16,а) та ЦА імуніцитів у МТТ-тесті з алогенними клітинами гліоми (на 16 %,  $p = 0,03$ , U-критерій Манна-Уїтні; рис.16,б).

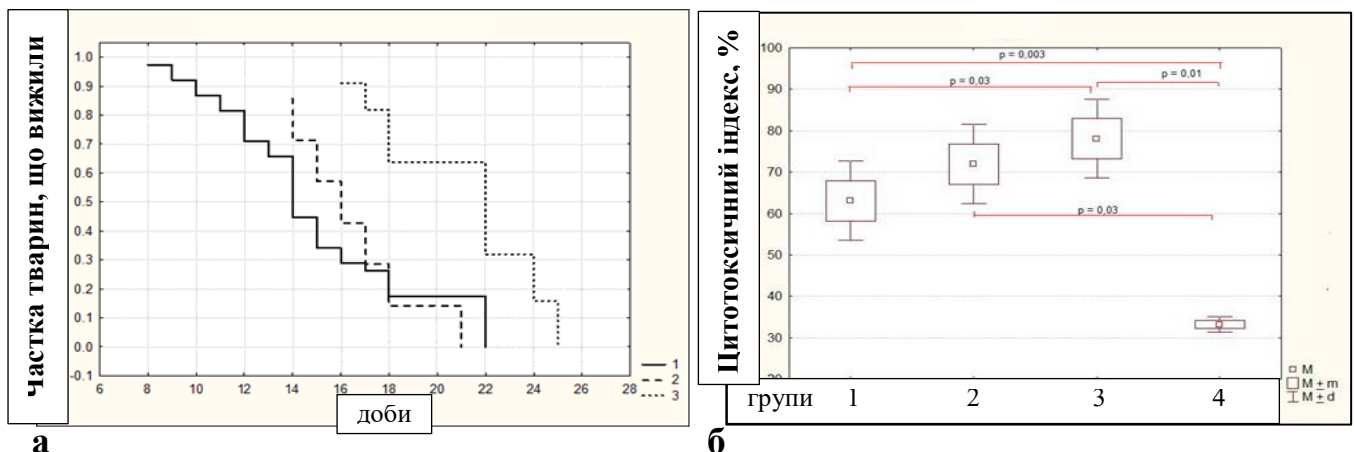


Рис.16. Тривалість життя (а) та цитотоксична активність мононуклеарів селезінки (б) тварин з гліомою 101.8 (1,  $n = 12$ ) та в/о введенням алогенної пухлинної вакцини, модифікованої 0,02 мг/мл (2,  $n = 12$ ) та 0,10 мг/мл (3,  $n = 12$ ) КСНК. 4 – інтактні щури ( $n = 6$ ). М – середнє значення; m – стандартна похибка середнього значення; d – середнє квадратичне відхилення від середнього значення.

Імовірно, за впливу складових КСНК –  $IFN-\alpha$ ,  $IL-1\beta$  та  $TGF-\beta 1$  – у клітинах гліоми 101.8 активуються сигнальні шляхи, які підвищують експресію антигенів МНС та

компонентів механізму процесингу антигенів, що сприяє ефективному розпізнаванню імуніцитами клітин гліоми та забезпечує їх імунозалежний цитоліз, подовжуючи тривалість життя тварин з пухлинами.

**Вплив кондиційованого середовища нейрогенних клітин фетального мозку щура у культурах клітин експериментальних гліом.** КСНК фетального мозку щурів (E8-11, E12-16) виявляють цитотоксичну та антимиотичну дію на клітини гліоми щура 101.8 та С6, що дозозалежно посилюється із збільшенням терміну гестації ( $p \leq 0,05$ ) та тривалості інкубації ( $p \leq 0,05$ ; рис.17). У контрольних культурах клітин нормального мозку щура цитотоксичний вплив незначний (ЦІ  $\leq (2,25 - 17,24)$  %,  $p \leq 0,006$  порівняно з культурами гліом). За впливу КСНК (E12-16) у культурах гліоми С6 у 2,7 рази зменшується частка Ki-67<sup>+</sup> пухлинних клітин ( $p = 0,002$ ; рис.18), що доводить антипроліферативний ефект КСНК. Кількість клітин гліоми С6, що експресують CD133 – маркер стовбурових клітин пухлин мозку (СКПМ) та їх прогресії [Masoumi S., 2016; Lee S.Y., 2017; Singh V.K., 2017] за впливу КСНК зменшується у 4 рази ( $p = 0,02$ ; рис.18).

За впливу КСНК (E12-16) в культурах гліоми С6 частка TGF- $\beta$ 1<sup>+</sup>-клітин зменшується в 1,7 рази ( $p = 0,0003$ ), натомість частка p53<sup>+</sup>-клітин зростає у 2 рази ( $p = 0,01$ ; рис.18), що засвідчує проапоптотичну дію КСНК. Цей ефект нівелюється за одночасного додавання КСНК та моноклональних антитіл до TGF- $\beta$ 1 ( $p = 0,05$ ,  $p = 0,003$ , U-критерій Манна-Уїтні; рис.19,а,б), що підтверджує вплив складової КСНК – TGF- $\beta$ 1.

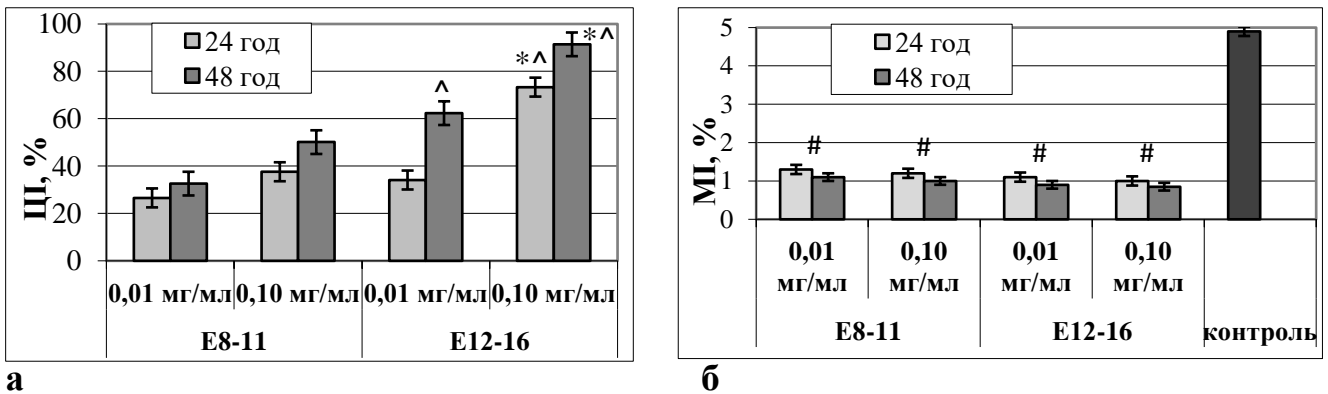


Рис.17. Цитотоксичний (а) та антимиотичний (в) вплив КСНК (E8-11, E12-16) у культурах гліом щура 101.8 ( $n = 12$ ). ЦІ – цитотоксичний індекс (%), МІ – мітотичний індекс (%). Відмінності статистично значущі у порівнянні з контролем (#), за впливу КСНК різних концентрацій (^) та термінів гестації (\*),  $p \leq 0,05$ , t-критерій Стьюдента.

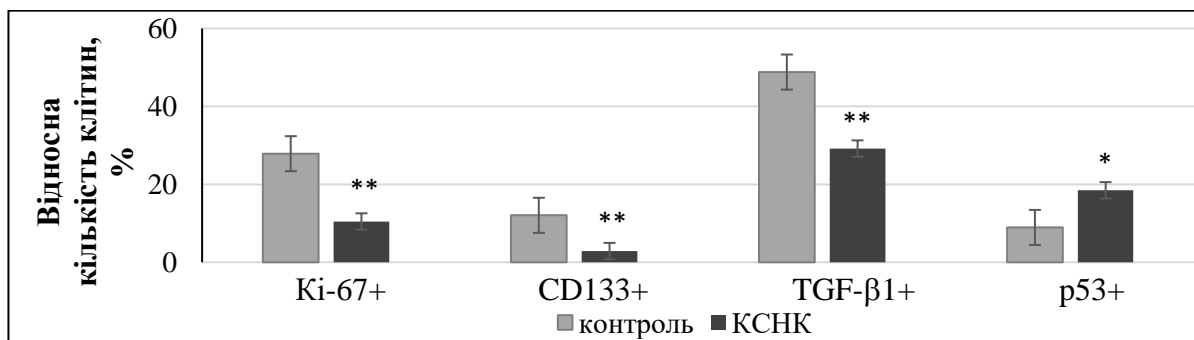


Рис.18. Вплив КСНК щура (E12-16) на експресію маркерів пухлинної прогресії та апоптозу клітинами гліоми С6 ( $n = 16$ , \* –  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; U-критерій Манна-Уїтні).

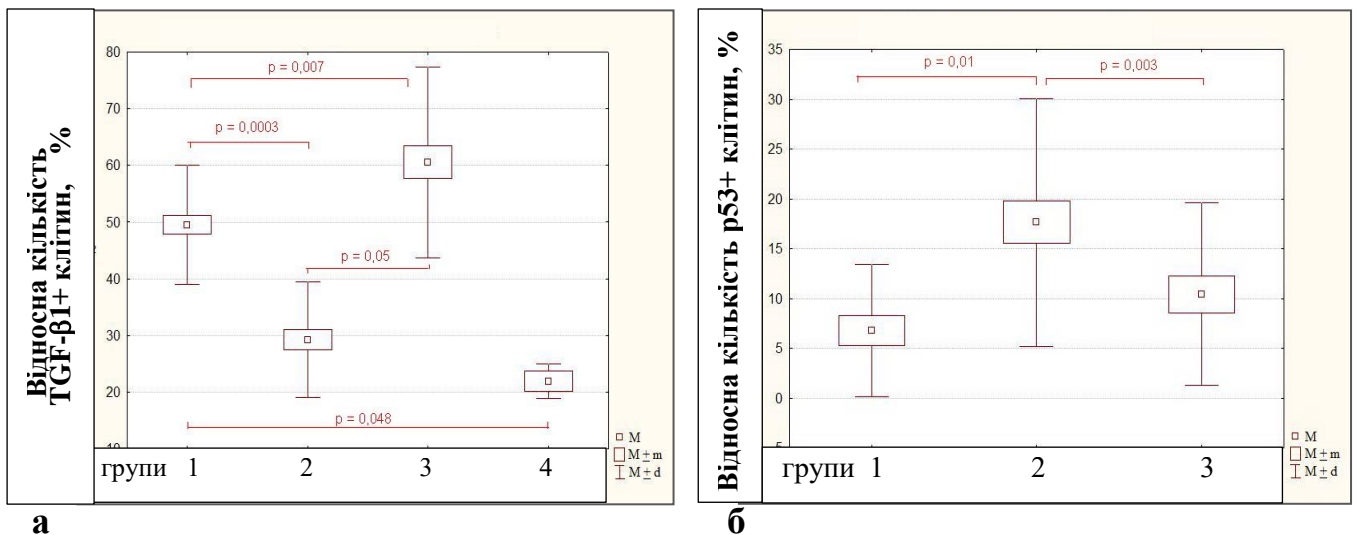


Рис.19. Кількість TGF-β1-позитивних (а) та p53-позитивних (б) клітин у культурах гліоми С6 щура: 1 – культура гліоми С6, контроль; 2 – культура гліоми С6, інкубація з КСНК (Е14), 0,10 мг/мл, 48 год; 3 – культура гліоми С6, одночасна інкубація з КСНК (Е14, 0,10 мг/мл) та антитілами до TGF-β1 (0,10 мг/мл), 48 год; 4 - культура нейрогенних клітин фетального мозку (Е14), контроль. М – середнє значення; m – стандартна похибка середнього значення; d – стандартне відхилення від середнього значення.

Встановлений факт нейтралізації ефекту КСНК в культурах гліоми *in vitro* моноклональними антитілами до TGF-β1 доводить ключову роль саме TGF-β1 як складової КСНК. Слід вказати, що TGF-β вважають важливим медіатором злякисного фенотипу гліом головного мозку, регулятором проліферації, диференціації, виживання або апоптозу, рухливості, інвазивності, ангіогенезу, метастазування, ухиляння від імунного контролю і підтримання СКПМ та розглядають як потенційну мішень для таргетної терапії злякисних гліом [Zhang J., 2014; Frei K., 2015; Lee H., 2017; Naque S., 2017]. Отримані нами дані доповнюють результати щодо зменшення життєздатності, інвазивності СКПМ експериментальних гліом та подовження СТЖ тварин з пухлинами при застосуванні інгібіторів TGF-β-сигнальних шляхів [Ye X.Z., 2012; Kaminska B., 2013] та комбінованому лікуванні вакциною на основі гліома-асоційованих антигенних пептидів [Ueda R., 2009].

Отже, КСНК фетального мозку, що є ключовим компонентом мікрооточення («ніші») НСК / НПК, виявляє імуномодульовальні та протипухлинні властивості *in vitro* та *in vivo* за рахунок складових елементів – продукованих цими клітинами цитокінів BDNF, TGF-β1, IFN-α, IL-1β, IL-4. Ці молекули активують у клітинах сигнальні каскади, внаслідок чого: 1) в імуніцитах змінюється співвідношення активаційних і диференційних антигенів та експресованих цитокінів, підвищується ЦА стосовно клітин гліом; 2) у клітинах гліом зростає експресія маркерів апоптозу (CD95<sup>+</sup>, PI<sup>+</sup>, p53<sup>+</sup>); знижується експресія маркерів пухлинної прогресії CD133, Ki-67, TGF-β1; змінюється імуносупресивний цитокіновий баланс (зростає продукція IFN-α, TNF-α, знижується експресія TGF-β2, IL-10); підвищується експресія МНС I,II; що забезпечує ефективне розпізнавання та імунозалежний цитоліз клітин пухлини ЦТЛ та ПК і сприяє подовженню життя тварин з гліомою головного мозку. Узагальнена схема окремих ланок механізмів імуномодульовального та протипухлинного впливу КСНК щура представлена на рис.20.

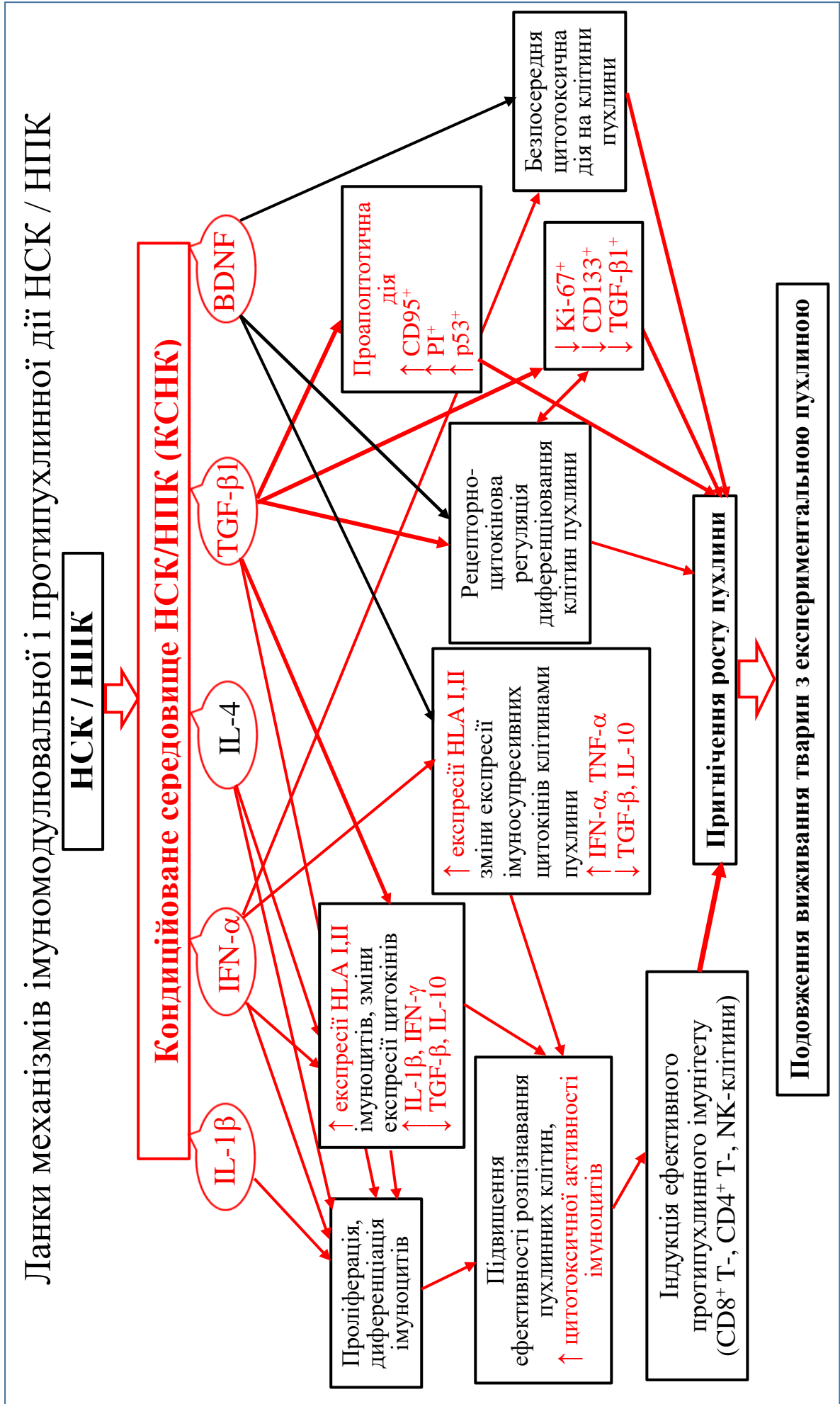


Рис.20. Узагальнена схема окремих ланок механізмів імунomodулювальної та протипухлинної дії КСНК фетального мозку.

Отримані дані щодо імуномодулювального та протипухлинного впливу КСНК щура доводять перспективність обраного напрямку досліджень та створюють базис для теоретичного обґрунтування розробки препаратів на основі КСНК фетального мозку для включення їх до складу комплексної патогенетичної терапії хворих з гліомами.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення науково-прикладної проблеми – розкриття імунобіологічних властивостей нейрогенних клітин фетального мозку для обґрунтування розробки підходів щодо їх застосування у лікуванні захворювань нервової системи. Визначено антигенні, імуногенні, імуномодулювальні і протипухлинні характеристики нейрогенних клітин фетального мозку. На основі вивчення механізмів дії цих клітин на клітини імунної системи та клітини гліом головного мозку науково обґрунтовано нові методичні підходи до підвищення ефективності комплексної патогенетичної терапії при гліальних пухлинах головного мозку. У відповідності до сформульованих завдань і отриманих результатів дослідження зроблені наступні висновки:

1. Розроблено спосіб культивування *in vitro* клітин фетального головного мозку у безсироватковому середовищі DMEM з додаванням ретинола ацетату. Ретинола ацетат стимулює проліферацію НСК/НКП та індукує формування багатоклітинних конгломератів; послідовний вплив ретинола ацетату і ретиноєвої кислоти індукує нейрональне диференціювання. Нейрогенні клітини фетального мозку при культивуванні у вказаних умовах зберігають мультипотентні властивості у набутті фенотипових ознак нейронів (експресія NSE), астроцитів (експресія GFAP) та олігодендроцитів (експресія ОБМ).

2. Культури нейрогенних клітин фетального мозку містять ( $49,16 \pm 10,60$ ) % нестин-позитивних, ( $37,36 \pm 12,33$ ) % CD133-позитивних, ( $77,0 \pm 13,9$ ) % віментин-позитивних, ( $80,0 \pm 5,0$ ) % GFAP-позитивних клітин. Частка клітин, імунопозитивних на TGF- $\beta$ 1, становить ( $22,04 \pm 2,33$ ) % від загальної кількості клітин в культурі, що свідчить про потенційні імуномодулювальні властивості нейрогенних клітин фетального мозку.

3. Нейроклітини головного мозку людини 5-9 тижнів гестації містять ( $15,7 \pm 2,4$ ) % HLA-A,B,C-позитивних клітин і ( $17,7 \pm 4,0$ ) % HLA-DR-позитивних клітин. Експресія мРНК генів HLA-A1a, HLA-DRa1, HLA-DQb1, СІТА є незначною або відсутня. При культивуванні нейроклітин людини 5-9 тижнів гестації в середовищі DMEM з додаванням ретинола ацетату відбувається зменшення кількості клітин, що експресують антигени HLA I і II класу, тоді як присутність у середовищі факторів росту / цитокінів сприяє збереженню (FGF) або зростанню (EGF, INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) кількості цих клітин.

4. Після внутрішньоочеревинного та внутрішньомозкового введення фетальних НПК (E13-15) у тварин-реципієнтів індукуються клітинні та гуморальні алоспецифічні імунні реакції, що набувають більш виразного прояву при внутрішньоочеревинному введенні клітин: алоцитотоксична активність імуноцитів реципієнтів зростає відповідно у 1,5-2 рази (максимальний рівень) на 6-у добу: алоцитотоксична активність антитіл зростає у 2,7-4 рази (максимальний рівень) на 12-у добу, та поступово знижуються до 37-ї доби. Інтенсивність клітинної та гуморальної алоімунної відповіді на фетальні НПК нижча за

відповідь на клітини лімфовузлів дорослих тварин, на яких повноцінно представлені антигени гістосумісності.

5. Внутрішньоочеревинне введення алогенних фетальних НПК викликає у тварин-реципієнтів утворення нейроспецифічних антитіл до ОБМ та S-100, кількість яких збільшується до 37-ї доби у 1,3 та 2 рази відповідно. Внутрішньомозкове введення алогенних фетальних НПК спричиняє більш значуще утворення нейроспецифічних антитіл до ОБМ та NSE, кількість яких зростає до 37-ї доби в 1,4-1,7 рази. У тварин із внутрішньомозковим сингенним трансплантатом фетальних НПК (E13-15) не зареєстрована гуморальна аутоімунна відповідь до нейроспецифічних антигенів. Імуносупресивний препарат циклоспорин А гальмує алоспецифічну та аутоімунну відповідь до нейроспецифічних антигенів у тварин-реципієнтів алогенних фетальних нейроклітин при використанні триразового введення препарату (5 мг/кг).

6. Після внутрішньомозкового введення алогенних фетальних НПК у тканині головного мозку навколо пункційного каналу виявляються ознаки перицелюлярного набряку та лімфоцитарна інфільтрація на 12-18-у добу, зменшуючись до 37-ї доби. Введені НПК зберігаються до 18-ї доби спостереження та виявляють ознаки початкового нейронального диференціювання, які є більш виразними за умов імуносупресії циклоспорином А. Інтенсивність і тривалість морфологічних змін після внутрішньомозкової імплантації фетальних НПК корелює з проявами алоспецифічних та нейроспецифічних імунних реакцій. Вогнищеві реакції клітин глії на введені НПК зменшуються у випадку сингенних НПК до 18-ї доби, алогенних НПК - до 37-ї доби.

7. Кондиційоване середовище нейрогенних клітин (КСНК) фетального мозку щура у своєму складі містить фракції з наявністю BDNF (115 пг/мл), TGF- $\beta$ 1 (12,00 пг/мл), IFN- $\alpha$  (7,4 пг/мл), IL-1 $\beta$  (0,90 пг/мл) та IL-4 (1,63 пг/мл). КСНК впливає на синтез цитокінів мононуклеарами периферичної крові: продукція TNF- $\alpha$  мононуклеарами осіб групи контролю зменшується утричі ( $p = 0,05$ ), а IL-1 $\beta$  та IL-10 – зростає (відповідно в 10 і 3 рази,  $p = 0,003$ ,  $p = 0,05$ , U-критерій Манна-Уїтні). Після впливу кондиційованого середовища нейрогенних клітин фетального мозку щура мононуклеари пацієнтів з гліомами головного мозку знижують продукцію TNF- $\alpha$  і IL-10 (відповідно в 10 і 6 разів,  $p = 0,008$ ,  $p = 0,05$ ; U-критерій Манна-Уїтні). За внутрішньоочеревинного введення КСНК інтактним тваринам зростає цитотоксична активність імуніцитів у 2-2,5 рази стосовно ксеногенних і алогенних клітин гліоми ( $p = 0,008$ ,  $p = 0,016$ ; U-критерій Манна-Уїтні).

8. Кондиційоване середовище нейрогенних клітин фетального мозку щура виявляє цитотоксичний та антимиотичний вплив у культурах гліом головного мозку людини: цитотоксичний індекс становить ( $34,30 \pm 11,60$ ) %, мітотичний індекс знижується в 1,6 – 4 рази. За впливу кондиційованого середовища нейрогенних клітин фетального мозку щура клітини гліобластом підвищують продукцію IFN- $\alpha$  (в 14 разів) та TNF- $\alpha$  (удвічі,  $p = 0,025$ ,  $p = 0,04$ ,  $p = 0,64$ , тест ANOVA Краскела-Уолліса).

9. Кондиційоване середовище нейрогенних клітин фетального мозку щура виявляє цитотоксичний, антимиотичний та антипроліферативний вплив на культивовані клітини гліом щура 101.8 та С6: загальна кількість клітин зменшується у 1,7 рази, мітотичний індекс – у 4,4 рази, кількість проліферуючих (Ki-67-позитивних) пухлинних клітин – у 2,7 рази, кількість CD133-позитивних (стовбурових) пухлинних клітин – у 4 рази, частка TGF- $\beta$ 1-позитивних пухлинних клітин – у 1,7 рази, натомість кількість p53-позитивних

клітин збільшується у 2 рази. При одночасному додаванні до клітин гліоми С6 КСНК та моноклональних антитіл до TGF- $\beta$ 1 відбувається нейтралізація біологічного ефекту КСНК, засвідчуючи, що встановлені *in vitro* протипухлинні ефекти КСНК реалізуються за рахунок впливу TGF- $\beta$ 1, який входить до складу КСНК щура.

10. Обробка клітин гліоми 101.8 КСНК (0,02 та 0,10 мг/мл) знижує їх пухлиноіндукувальну здатність: середня тривалість життя дослідних тварин збільшується в 1,9 рази, медіана виживаності – в 2 – 2,2 рази ( $p = 0,000001$ , критерій Вілкоксона-Гехана), цитотоксична активність імуніцитів тварин з пухлиною підвищується відповідно на 16 % ( $p = 0,066$ ) та 21 % ( $p = 0,008$ , U-критерій Манна-Уїтні). КСНК (1 мг/кг) у режимах внутрішньоочеревинного введення (трикратно з 5-ї по 10-ту добу після перевивання пухлини та за тиждень до її перевивання) збільшує середню тривалість життя та медіану виживаності дослідних тварин у 1,3 рази ( $p < 0,02$ , критерій Вілкоксона-Гехана), цитотоксична активність імуніцитів тварин з пухлиною зростає на 12 % ( $p = 0,24$ ) та 22 % ( $p = 0,009$ , U-критерій Манна-Уїтні).

11. Внутрішньоочеревинне введення тваринам з гліомою 101.8 алогенної пухлинної вакцини, модифікованої КСНК (0,10 мг/мл), збільшує середню тривалість життя в 1,4 рази та медіану виживаності у 1,5 рази ( $p = 0,0002$ , критерій Вілкоксона-Гехана) та підвищує цитотоксичну активність імуніцитів щурів з гліомою 101.8 на 16 % ( $p = 0,03$ , U-критерій Манна-Уїтні).

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Монографія:*

1. Любич ЛД. Получение стволовых клеток головного мозга и их направленная дифференцировка. В: Зозуля Ю.А., Лисяний М.И., редакторы. Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток. Киев: ООО УИПК «ЕксОб», 2005. с. 74-98.

### *Статті у наукових фахових виданнях України:*

2. Лисяний МІ, Любич ЛД, Бичкова СА. Апоптоз лімфоцитів периферичної крові та експресія ними FAS-рецептора у хворих на гліому головного мозку. Онкологія. 2005;7(2):106–8. *(Здобувачем особисто виконано дослідження апоптозу лімфоцитів, взята участь у аналізі результатів та написанні статті).*

3. Лисяний МІ, Любич ЛД, Семенова ВМ, Стайно ЛП, Главацький ОЯ, Висоцький МС. Дослідження експресії антигенів HLA нейроклітинами людини різного терміну гестації *in vitro*. Імунологія та алергологія. 2008;(1):14–9. *(Здобувачем особисто виконано культивування та імунофенотипування клітин, визначення експресії мРНК генів HLA, аналіз та статистичну обробку результатів дослідження, написання статті).*

4. Лисяний МІ, Любич ЛД, Хохлов АГ. Дослідження протипухлинної дії прогеніторних нейроклітин (НК) при експериментальній гліомі головного мозку у щурів. Імунологія та алергологія. 2008;(3):61–6. *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз одержаних даних, написання статті).*

5. Лісяний МІ, Любич ЛД. Особливості розвитку імунної відповіді на внутрішньомозкове введення алогенних фетальних нейроклітин в експерименті. Імунологія та алергологія. Наука і практика. 2009;(4):99–109. *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів дослідження, написання статті).*

6. Лісяний МІ, Любич ЛД. Методика дослідження цитотоксичної активності імунокомпетентних клітин МТТ-колориметричним методом. Імунологія та алергологія. Наука і практика. 2010;(3):54–9. *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів дослідження, написання статті).*

7. Лісяний МІ, Любич ЛД. Динаміка імунної відповіді на ало- та тканинні антигени фетальних нейроклітин в експерименті. Імунологія та алергологія. Наука і практика. 2010;(4):104–11. *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

8. Любич ЛД. Визначення антитілоутворення до нейроспецифічних білків (НСБ) при внутрішньомозковому введенні сингенних та алогенних фетальних нейроклітин-прекурсорів (НКП). Імунологія та алергологія. Наука і практика. 2011;(2):97-102.

9. Любич ЛД, Семенова ВМ, Лісяний МІ. Морфологічне дослідження мозку при внутрішньомозковій імплантації алогенних нейроклітин в експерименті. Імунологія та алергологія. Наука і практика. 2011;(3):38–45. *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

10. Любич ЛД, Лісяний МІ, Семенова ВМ, Главацький ОЯ, Лісяний ОМ, Стайно ЛП. Особливості цитотоксичної дії галавіту на клітини гліом та моноклеари периферичної крові хворих з гліомами *in vitro*. Імунологія та алергологія. Наука і практика. 2012;(1):66–76. *(Здобувачем особисто виконано імунологічні дослідження, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

11. Любич ЛД. Оцінка впливу супернатанту прогеніторних нейроклітин щура на експресію антигенів CD25 та CD95 клітинами гліом людини. Імунологія та алергологія. Наука і практика. 2012;(2):31–6.

12. Любич ЛД. Продукція цитокінів моноклеарами периферичної крові хворих з гліомами головного мозку *in vitro* за умов впливу супернатанту прогеніторних нейроклітин щура. Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник. ГЗЗ Випуск 36. Київ, 2012. с.148–56.

13. Любич ЛД. Вплив супернатанту прогеніторних нейроклітин щура на експресію антигенів НЛА моноклеарами периферичної крові та клітинами пухлин хворих з гліомами головного мозку *in vitro*. Імунологія та алергологія. Наука і практика. 2013;(1):4–14.

14. Liubich LD. Comparative study of rat neural cells supernatant and immunomodulatory preparations influence on the peripheral blood mononuclear cells of patients with brain gliomas *in vitro*. Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник. ГЗЗ Випуск 37. Київ, 2014. с.156–65.

*Статті у наукових фахових виданнях України,  
які входять до міжнародних наукометричних баз даних:*

15. Лісяний МІ, Любич ЛД, Черченко АП, Верхоглядюв ЮП. Вплив алогенної внутрішньомозкової трансплантації ембріональних клітин-попередників нервової системи на гуморальну аутоімунну відповідь до нейроспецифічних білків у кролів. *Фізіол журн.* 2006;52(3):64–9. (SCOPUS) *(Здобувачем особисто виконано культивування клітин, імуноцитохімічні та імуноферментні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів дослідження, написання статті).*
16. Лісяний МІ, Любич ЛД, Семенова ВМ, Стайно ЛП, Висоцький МС, Потапова АІ. Визначення експресії антигенів HLA нейроклітинами людини різного терміну гестації при культивуванні *in vitro*. *Проблеми криобіології.* 2008;18(4):486-9. (SCOPUS) *(Здобувачем особисто виконано культивування та імунофенотипування клітин, визначення експресії мРНК генів HLA, аналіз та статистичну обробку результатів дослідження, написання статті).*
17. Lyubich LD, Lisyanyu MI. Effect of Sandimmun on Immune Response Development in Mice after Intraperitoneal and Intracerebral Introduction of Allogeneic Fetal Neural Cells. *Problems of cryobiology.* 2012;22(4):468–83. (SCOPUS) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*
18. Любич ЛД, Семенова ВМ, Лісяний МІ. Порівняльна патоморфологічна оцінка клітинно-тканинних реакцій мозку мишей-реципієнтів на імплантацію сингенних та алогенних нейроклітин. *Фізіол журн.* 2013;59(4):40–50. (SCOPUS) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз результатів дослідження, написання статті).*
19. Lyubich LD, Lisyany MI. Effects of the neurogenic cells supernatant on the tumor-inducing ability of glioma 101.8 in rats. *Клітинна та органна трансплантологія. Cell and Organ Transplantology.* 2015;3(1):57–61. (Index Copernicus) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*
20. Liubich LD, Semenova VM, Stayno LP. Influence of rat progenitor neurogenic cells supernatant on glioma 101.8 cells *in vitro*. *Biopolymers and Cell.* 2015;31(3):200–8. (SCOPUS) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*
21. Любич ЛД, Лісяний МІ. Вплив супернатанта прогеніторних нейроклітин на цитотоксичну функцію лімфоцитів у щурів з гліомою. *Фізіол журн.* 2015;61(4):63–70. (SCOPUS) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*
22. Liubich LD, Lisyany NI. Anticancer efficacy of allogeneic vaccine modified with progenitor neural cells supernatant in rats with glioma 101.8. *Exp Oncol.* 2015 Sep;37(3):203-7. (SCOPUS) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*
23. Liubich LD, Lisyany NI, Semenova VM, Stayno LP. Dynamics of CD133+ cells in cultures of glioma C6 and fetal rat brain under the neurogenic cells supernatant

influence. Клітинна та органна трансплантологія. Cell and Organ Transplantology. 2015;3(2):150–4. (Index Copernicus) *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

24. Любич ЛД, Семенова ВМ, Малишева ТА, Стайно ЛП, Васлович ВВ. Вплив супернатанта фетальних нейрогенних клітин на проліферативну активність у культурі клітин гліоми С6. Нейрофізіологія. Neurophysiology. 2016;48(4):265-72. (Web of Science, SCOPUS) *(Здобувачем особисто виконано культивування клітин та отримання кондиційованого середовища, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

25. Liubich LD, Lisyany MI, Malysheva TA, Semenova VM, Staino LP, Vaslovich VV. Morphometric characteristics of TGF- $\beta$ 1-positive cells of fetal rat brain in vitro. Клітинна та органна трансплантологія. Cell and Organ Transplantology. 2016;4(2):211–5. (Index Copernicus) *(Здобувачем особисто виконано культивування клітин та отримання кондиційованого середовища, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

*Статті в іноземних виданнях:*

26. Любич ЛД, Лисяный НИ, Семенова ВМ, Стайно ЛП. HLA-антигенная характеристика нативных и культивируемых нейроклеток фетального и постнатального головного мозга человека. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2010; 25:47–59. *(Здобувачем особисто виконано культивування клітин та їх імунофенотипування, визначення експресії мРНК генів HLA, аналіз одержаних даних та проведення їх статистичної обробки, написання статті).*

27. Семенова ВМ, Любич ЛД, Лисяный НИ, Главацкий АЯ, Стайно ЛП. Исследование биологических свойств супернатанта прогениторных нейроклеток крыс на культурах глиом головного мозга. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2011; 27:58–68. *(Здобувачем особисто виконано культивування клітин та отримання кондиційованого середовища, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз одержаних даних, написання статті).*

28. Семенова ВМ, Любич ЛД, Стайно ЛП, Высоцкий НС, Медведев ВВ, Егорова ДМ. Сравнительное изучение способности к дифференцировке культивируемых нейральных стволовых клеток из ольфакторной луковицы человека. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2013;29:23–35. *(Здобувачем особисто виконано імуноцитохімічні дослідження, взята участь в аналізі та інтерпретації одержаних даних, підготовці статті до друку).*

29. Любич ЛД, Семенова ВМ, Стайно ЛП, Главацкий АЯ. Сравнительная оценка цитотоксического воздействия супернатанта нейрогенных клеток крысы и препарата галавит на культуры глиобластом человека. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2015;31:3–14. *(Здобувачем особисто виконано культивування та імунофенотипування клітин, отримання кондиційованого середовища, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

30. Любич ЛД, Лисяный МИ, Семенова ВМ. Изучение иммуноморфологических реакций при внутримозговом введении фетальных аллогенных нейроцитов у мышей. *Нейроиммунология*. 2016;XIII(1–2):83-91. *(Здобувачем особисто виконано експериментальні дослідження, взята участь у морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

31. Любич ЛД. Исследование механизмов воздействия супернатанта нейрогенных клеток фетального мозга крысы на клетки экспериментальной глиомы С6 в условиях культивирования. *Клеточные культуры. Информационный бюллетень*. 2017;33:14–26.

*Основні тези наукових доповідей:*

32. Любич ЛД, Лисяный НИ. Влияние нейротрофического фактора S-100 на эмбриональные нейроциты экспериментальных животных *in vitro*. В: *Материалы XIII Всеросс. конф. Нейроиммунология*; 2004 май 24-27; С.-Петербург, РФ. *Нейроиммунология*. 2004;2(2):65.

33. Лисяный НИ, Любич ЛД, Петренко АЮ. Культивирование эмбриональных нейроцитов *in vitro*. В: *Материалы междунар. симп. по биологии клетки в культуре “Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия”*; 2004 окт. 25-27; С.-Петербург, РФ. *Цитология*. 2004;46(10):925.

34. Любич ЛД, Лисяный НИ. Исследование модулирующего действия аллогенных эмбриональных нейроцитов на клетки опухоли головного мозга человека *in vitro*. В: *Тез. докл. Всеросс. симп. Биология клетки в культуре*; 2006 окт. 17-19; С.-Петербург, РФ. *Цитология*. 2006;48(9):777.

35. Любич ЛД. Исследование действия эмбриональных нейроцитов на клетки опухоли головного мозга человека *in vitro*. В: *Материалы XVI Всеросс. конф. Нейроиммунология. Нейроимидж*; 2007 май 23-26; С.-Петербург, РФ. *Нейроиммунология*. 2007;5(2):75.

36. Семенова ВМ, Любич ЛД, Стайно ЛП, Медведев ВВ, Величко ОН. Получение глиально-обогащенной фракции культивируемых нейроцитов для внутримозговой нейротрансплантации. В: *Тез. докл. II съезд Общества клет. биологии совместно с юбилейной конф.-ей, посвящ. 50-летию Ин-та цитологии РАН*; 2007 окт. 16-19; С.-Петербург, РФ. *Цитология*. 2007;49(9):791.

37. Любич ЛД. Імуномодулюючі властивості клітин ембріонального мозку. В: *Матеріали IV з'їзду нейрохірургів України*. 2008 трав. 27-30; Дніпропетровськ. Дніпропетровськ: ТОВ «ЕНЕМ»; 2008, с.209.

38. Лисяний МІ, Любич ЛД, Семенова ВМ, Главацький ОЯ, Стайно ЛП, Висоцький МС, Потапова АІ. Експресія антигенів гістосумісності нейроклітинами людини різного терміну гестації *in vitro*. В: *Наукові статті та матеріали наук.-практ. конф. за участі міжнародних спеціалістів. Трансплантація органів, тканин та клітин*; 2008 лист. 21-22; Київ. *Трансплантологія*. 2008;10(1):125-9.

39. Любич ЛД, Лисяный НИ, Семенова ВМ, Стайно ЛП. Антигенная характеристика нейральных стволовых клеток из ольфакторной луковицы человека в условиях культивирования. В: *Тез. докл. Всеросс. симп. по биологии клетки в*

культуре. Культивируемые клетки как основа клеточных технологий; 2009 окт. 12-14; С.-Петербург, РФ. Цитология. 2009;51(9):775-6.

40. Любич ЛД, Лисяний МІ. Дослідження антитілоутворення до нейроспецифічних білків (НСБ) при внутрішньомозковому введенні сингенних та алогенних фетальних нейроклітин-прекурсорів (НКП). В: Матеріали наук.-практ. конф. нейрохірургів України за участю НДІ нейрохірургії ім. акад. М.Н. Бурденка РАМН. Проблеми реконструктивної та відновної нейрохірургії; 2010 жовт. 7-8; Партеніт, АР Крим. Укр.нейрохірург.журн. 2010;(3):33.

41. Любич ЛД, Семенова ВМ, Лисяний НИ. Сравнительное морфологическое исследование мозга при внутримозговой имплантации алло- и сингенных фетальных нейроклеток-предшественников (НКП) в эксперименте. В: Материалы X Юб. Всеросс. науч.-практ. конф. Поленовские чтения; 2011 апр. 19-22; С.-Петербург. Росс нейрохирург журн им.проф. А.Л.Поленова. 2011;III(Спецвыпуск):454.

42. Любич ЛД, Лисяний МІ, Семенова ВМ. Дослідження впливу супернатанту прогениторних нейроклітин щура на пухлини головного мозку *in vivo* та *in vitro*. В: Матеріали XII з'їзду онкологів України; 2011 вер. 20-22; Судак, АР Крим. Клиническая онкология. 2011;II(Спецвыпуск):219.

43. Любич ЛД. Иммунобиологические свойства культивируемых фетальных нейроклеток-прекурсоров (НКП). В: Тез. докл. Школа-конф. для молодых ученых. Клеточные технологии для регенеративной медицины; 2011 окт. 17-25, С.-Петербург, РФ. Цитология. 2011;53(9):738-9.

44. Lyubich LD. Evaluation of rat progenitor neural cells supernatant action on cultivated glioma cells and peripheral blood mononuclear cells of patients with brain glioma *in vitro*. В: Збірник тез 3-го з'їзду Укр. тов. кліт. біології з міжнар. предст. 2012 трав. 16-20; Ялта, АР Крим. с.121.

45. Lyubich LD, Lisyany MI. Effect of Sandimmun on Development of Immune Response Under Intraperitoneal Injection of Allogeneic Fetal Neural Cells in Mice. В: Тези доп. наук. конф. Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины; 2012 жовт. 18-19; Харків. Проблемы криобиологии. Problems of cryobiology. 2012;22(3):372.

46. Любич ЛД. Иммуногенные свойства фетальных нейроклеток у мышей. В: Тезисы докл. VI ежегод. междунар. симп. Актуальные вопросы генных и клеточных технологий. 2013 окт. 11-12; Москва, РФ. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013;VIII(3):41.

47. Семенова ВМ, Лисяний НИ, Любич ЛД, Петренко АЮ, Стайно ЛП. Индукция нейрогенной дифференцировки стволовых нейроклеток эмбрионального мозга человека. В: Тез. докл. Всеросс. симпозиум по биологии клетки в культуре: 2013 окт. 23-25; С.-Петербург, РФ. Цитология. 2013;55(9):655-6.

48. Любич ЛД, Лисяний НИ. Влияние супернатанта прогениторных нейроклеток на цитотоксическую функцию лимфоцитов у крыс с глиомой 101.8. В: Материалы XX Всеросс. конф. Нейроиммунология. Рассеянный склероз; 2015 май 28-31; С.-Петербург, РФ. Нейроиммунология. 2015;XII(1-2):66-7.

49. Liubich LD, Semenova VM, Malysheva TA, Stayno LP, Vaslovych VV. Reducing of C6 glioma cells proliferative activity under the influence of fetal neural cells

supernatant. В: Матеріали міжнар. конф. Advances in cell biology and biotechnology; 2015 жовт. 11-13; Львів. с.102.

50. Liubich LD, Lisyany NI, Semenova VM, Malysheva TA, Stayno LP, Vaslovych VV. The effect of the fetal neural cells supernatant in cultured C6 glioma cells. В: Збірник тез 5-го з'їзду Укр. тов. кліт. біології з міжнар. предст.; 2016 жовт. 2-6; Одеса. с.86.

51. Liubich L. Immunomodulatory impact of fetal rat brain neurogenic cells on the experimental brain tumor. In: 7<sup>th</sup> International Weigl Conference; 2017 Sept 26-29; Lviv, Ukraine. Poster #48. p.117.

52. Liubich LD, Lisyany MI, Semenova VM, Stayno LP. Expression of CD133 by glioma C6 cells under the influence of rat fetal brain neurogenic cells conditioned medium. In: International scientific conference. Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy; 2017 Oct 5-6; Kyiv. Exp Oncol 2017;39(3):248.

#### *Патенти:*

53. Зозуля ЮП, Лісяний МІ, Любич ЛД, винахідники; Державна установа «Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України», патентовласник. Спосіб отримання збагаченої суспензії стовбурових нейральних клітин. Деклараційний патент України на винахід № 71388 А. 2004 лист 15. *(Здобувачем особисто проведено патентні дослідження, написання патенту, взята участь у формулюванні формули винаходу).*

54. Лісяний МІ, Любич ЛД, Лісяний ОМ, винахідники; Державна установа «Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України», патентовласник. Спосіб визначення локальної пухлинної імуносупресії шляхом дослідження в клітинах пухлини супресивних цитокінів методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Патент України на корисну модель № 17905. 2006 жов 16. *(Здобувачем особисто проведено патентні дослідження, написання патенту, взята участь у формулюванні формули винаходу).*

55. Любич ЛД, Лісяний МІ, винахідники; Державна установа «Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України», патентовласник. Спосіб визначення сенсibiliзації до нейроспецифічних білків (НСБ) при нейротрансплантації алогенних прогеніторних нейроклітин фетального мозку. Патент України на корисну модель UA № 75057 U. 2012 лист 26. *(Здобувачем особисто проведено патентні дослідження, написання патенту, взята участь у формулюванні формули винаходу).*

56. Любич ЛД, Лісяний МІ, винахідники; Державна установа «Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України», патентовласник. Спосіб дослідження алоцитотоксичної активності імунокомпетентних клітин. Патент України на корисну модель UA № 75059 U. 2012 лист 26. *(Здобувачем особисто проведено патентні дослідження, написання патенту, взята участь у формулюванні формули винаходу).*

#### *Статті у наукових медичних фахових виданнях України:*

57. Зозуля ЮА, Лісяний НИ, Любич ЛД, Грищенко ВИ, Петренко АЮ, Бабийчук ГА. Длительное культивирование in vitro криоконсервированных и

нативных нейроклеток эмбрионов человека. Укр нейрохірург журн. 2003;(2):11–4. (Index Copernicus) *(Здобувачем особисто виконано культивування клітин, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів дослідження, написання статті).*

58. Зозуля ЮА, Семенова ВМ, Лисяний НИ, Любич ЛД, Высоцкий НС, Стайно ЛП, Медведев ВВ. Потенциальные свойства нейроклеток из обонятельной луковичи человека в условиях культивирования. Укр нейрохірург журн. 2006;(4):84–8. (Index Copernicus) *(Здобувачем особисто виконано імуноцитохімічні дослідження, взята участь в аналізі результатів, написанні статті).*

59. Семенова ВМ, Любич ЛД, Лисяний НИ, Петренко АЮ, Стайно ЛП. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал нейроклеток эмбрионального мозга человека в условиях культивирования. Укр нейрохірург журн. 2007;(1):68–71. (Index Copernicus) *(Здобувачем особисто виконано культивування клітин, взята участь в морфологічних дослідженнях, аналізі результатів, написанні статті).*

60. Зозуля ЮА, Семенова ВМ, Черченко АП, Любич ЛД, Стайно ЛП, Драгунцова НГ. Глиальнообогатенная фракция культивируемых нейроклеток как объект для внутримозговой нейротрансплантации. Журн АМН України. 2007;13(1):93–103. *(Здобувачем особисто виконано імуноцитохімічні дослідження, взята участь в аналізі результатів, написанні статті).*

61. Любич ЛД, Семенова ВМ, Стайно ЛП, Главацький ОЯ. Дослідження дії супернатанту прогеніторних нейроклітин щура на клітини культивованих гліом людини. Вісник морфології. 2014;20(1):192–7. *(Здобувачем особисто виконано культивування клітин та отримання кондиційованого середовища, взята участь в морфологічних дослідженнях, здійснено аналіз та статистичну обробку результатів, написання статті).*

62. Любич ЛД. Застосування методу культивування для експериментальної оцінки впливу супернатанту фетальних нейрогенних клітин на клітини гліоми С6. Вісник морфології. 2015;21(2):352–57.

## АНОТАЦІЯ

Любич Л.Д. Імунобіологічні властивості нейрогенних клітин фетального мозку. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню імунобіологічних і протипухлинних властивостей нейрогенних клітин фетального мозку (НКФМ) та їх гуморальних чинників.

Визначено фенотипові, проліферативні, диференціовальні характеристики НКФМ та показано їх здатність викликати *in vivo* алоспецифічні та нейроспецифічні імунні реакції, котрі супроводжуються морфологічними змінами тканини головного мозку і гальмуються циклоспорином А.

Встановлено імуномодуляторні властивості кондиційованого середовища нейрогенних клітин (КСНК) фетального мозку щура: вплив на експресію та продукцію

цитокінів (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF- $\beta$ 2) імуніцитами *in vitro* та стимуляцію їх цитотоксичної активності за внутрішньоочеревинного введення інтактним тваринам. Виявлено протипухлинні властивості КСНК у культурах клітин гліом головного мозку: дозозалежний цитотоксичний, антими́тотичний та антипроліферативний вплив, посилення експресії маркерів апоптозу (CD95, p53) та МНС I,II, зниження експресії маркерів пухлинної прогресії (CD133, Ki-67, TGF- $\beta$ 1) та імуносупресивних цитокінів. Встановлено, що у складі КСНК наявні BDNF, TGF- $\beta$ 1, IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-4. У дослідженнях *in vivo* показано здатність КСНК знижувати пухлиноіндукувальний потенціал клітин гліоми, посилювати цитотоксичну функцію імуніцитів та подовжувати тривалість життя тварин з пухлинами. Доведено протипухлинну ефективність аlogenної пухлинної вакцини, модифікованої КСНК.

Ключові слова: нейрогенні стовбурові / прогеніторні клітини, фетальний мозок, МНС антигени, алоцитотоксичні імунні реакції, нейроспецифічні антитіла, кондиційоване середовище нейрогенних клітин, гліома головного мозку.

## АННОТАЦІЯ

Любич Л.Д. Иммунобиологические свойства нейрогенных клеток фетального мозга. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени доктора биологических наук по специальности 03.00.09 – иммунология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка МОН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию иммунобиологических и противоопухолевых свойств нейрогенных клеток фетального мозга (НКФМ) и их гуморальных факторов.

Определены фенотипические, пролиферативные, дифференцировочные характеристики НКФМ и показана их способность вызывать *in vivo* аллоспецифические и нейроспецифические иммунные реакции, сопровождающиеся морфологическими изменениями ткани головного мозга и тормозящиеся циклоспорином А.

Установлены иммуномодуляторные свойства кондиционированной среды нейрогенных клеток (КСНК) фетального мозга крыс: влияние на экспрессию и продукцию цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF- $\beta$ 2) иммуніцитами *in vitro* и стимуляцію їх цитотоксической активности при внутрибрюшинном введении интактным животным. Выявлены противоопухолевые свойства КСНК в культурах клеток гліом головного мозга: дозозависимое цитотоксическое, антими́тотическое и антипроліферативное влияние, усиление экспрессии маркеров апоптоза (CD95, p53) и МНС I,II, снижение экспрессии маркеров опухолевой прогрессии (CD133, Ki-67, TGF- $\beta$ 1) и иммуносупресивных цитокинов. Установлено наличие в составе КСНК BDNF, TGF- $\beta$ 1, IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-4. В исследованиях *in vivo* показана способность КСНК снижать опухолеиндуцирующий потенциал клеток гліомы, усиливать цитотоксическую функцию иммуніцитов и продлевать жизнь животных с опухолями. Доказана противоопухолевая эффективность алlogenной опухолевой вакцины, модифицированной КСНК.

Ключевые слова: нейрогенные стволовые / прогеніторные клетки, фетальный мозг, МНС антигены, аллоцитотоксические иммунные реакции, нейроспецифические антитела, кондиционированная среда нейрогенных клеток, гліома головного мозга.

## ANNOTATION

*Liubich L.D.* Immunobiological properties of neurogenic fetal brain cells. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for the scientific degree of Doctor of Biological Sciences by specialty 03.00.09 – immunology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The dissertation is devoted to the study of immunobiological and antitumor properties of the fetal brain neurogenic cells (FBNC) and their humoral factors.

The phenotypic, proliferative, differentiating features of FBNC have been determined in studies *in vitro*. The dynamics of expression of MHC antigens by FBNC during cultivation and their immunogenicity at introduction into the organism are determined. In studies *in vivo*, the development and comparative intensity of allospecific cell and humoral immune responses in animal recipients after intraperitoneal and intracerebral introduction of allogenic FBNC has been proved. The expression of MHC antigens by FBNC has been confirmed at a lower level, compared with immunocytes, but sufficient to induce allospecific immune responses. The development of neurospecific immune responses in recipients of allogenic FBNC, in contrast to syngenic, is indicated, certifying the involvement of antibodies to neuroantigens, along with antibodies to alloantigens in immune rejection reactions. The correlation of the intensity and duration of morphological changes in the brain tissue after intracerebral implantation of FBNC with manifestations of allospecific and neurospecific immune responses has been established and their inhibition by immunosuppression with cyclosporin A is confirmed, which substantiates the use of immunosuppression in the neurotransplantation of allogenic FBNC.

The immunomodulatory properties of the conditioned medium (CM) of the rat FBNC were ascertained: the effect on the expression and production of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF- $\beta$ 2) by peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals and patients with brain gliomas *in vitro*, and stimulation of cytotoxic activity of immunocytes in relation to xenogenic and allogenic tumor cells of glioma at intraperitoneal administration to intact animals. Antitumor properties of the CM in cell cultures of brain gliomas have been established: dose-dependent cytotoxic, antimetabolic and antiproliferative effects; increase of expression of markers of apoptosis (CD95, p53) and MHC I, II; reduce of expression of markers of tumor progression (CD133, Ki-67, TGF- $\beta$ 1) and immunosuppressive cytokines. Immunomodulatory and antitumor effects of the CM, which reproduce the microscale of the niche of neurogenic stem / progenitor cells in organism, are caused by the presence in its composition of BDNF, TGF- $\beta$ 1, IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-4. In experimental animals with transplanted cerebral glioma, it has been shown that the CM reduces the ability of glioma cells to induce tumors, increases cytotoxic activity of immunocytes and life expectancy and median survival of animals with tumors after intraperitoneal administration. The antitumor efficacy of allogeneic tumor vaccine, modified by CM, has been proved. The experimental data received in the dissertation study provide the basis for improving the methods of immune therapy of gliomas using biopreparations obtained from FBNC.

Key words: neurogenic stem / progenitor cells, fetal brain, MHC antigens, allocytotoxic immune responses, neurospecific autoantibodies, conditioned medium of neurogenic cells, brain glioma.

## ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

АПВ	алогенна пухлинна вакцина
КСНК	кондиційоване середовище нейрогенних клітин
ІФА	імуноферментний аналіз
МІ	мітотичний індекс
МНПК	мононуклеари периферичної крові
ОБМ	основний білок мієліну
НПК	нейрогенні прогеніторні клітини
НСБ	нейроспецифічні білки
НСК	нейрогенні стовбурові клітини
НЦ	нюхова цибулина
ПААГ	поліакриламідний гель
ПК	природні кілери
СКПМ	стовбурові клітини пухлин мозку
СТЖ	середня тривалість життя
ФТС	фетальна теляча сироватка
ЦА	цитотоксична активність
ЦІ	цитотоксичний індекс
ЦНС	центральна нервова система
ЦТЛ	цитотоксичні лімфоцити
ЧЩ	чисельна щільність
BDNF	( <i>brain-derived neurotrophic factor</i> ) нейротрофічний фактор мозку
EGF	( <i>epidermal growth factor</i> ) епідермальний ростовий фактор
FGF	( <i>fibroblast growth factor</i> ) фактор росту фібробластів
GFAP	( <i>glial fibrillary acidic protein</i> ) гліальний фібрилярний кислий білок
HLA	( <i>human leucocyte antigens</i> ) антигени гістосумісності людини
IFN	( <i>interferon</i> ) інтерферон
IL	( <i>interleukin</i> ) інтерлейкін
Ki-67	маркер проліферації
MHC	( <i>major histocompatibility complex</i> ) головний комплекс гістосумісності
NSE	( <i>neuron-specific enolase</i> ) нейронспецифічна єнолаза
PI	пропідія йодид
TGF	( <i>transforming growth factor</i> ) трансформувальний ростовий фактор
TNF	( <i>tumor necrosis factor</i> ) фактор некрозу пухлин