
МЕХАНИЗМ ИММУНОСУПРЕССИИ ПРИ ГЛИОМАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В.А. Фролов¹, С.П. Сяткин²

¹Кафедра общей патологии и патологической физиологии

²Кафедра биохимии

Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

**Н.Я. Гридина, Н.Г. Драгунцова,
О.И. Веселова**

Лаборатория экспериментальной нейрохирургии
Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова
Академии медицинских наук Украины
ул. Майбороды, 32, Киев, Украина, 04050

А.Ю. Чунихин

Лаборатория оптических методов исследования
Институт биохимии им. акад. А.В. Палладина НАН Украины
ул. Леонтовича, 9, Киев, Украина, 01601

В.П. Маслов, Ю.В. Ушенин

Отдел физико-технологических основ сенсорного материаловедения
Институт физики полупроводников им. В.Е. Лашкарёва НАНУ
просп. Науки, 41, Киев, Украина, 03083

У больных глиомами головного мозга разной степени злокачественности определяли активности ферментов ДАО и ПАО, синтезированных клетками крови, в культуральной среде в процессе превращения лимфоцитов в blasts при воздействии различных разведений ФГА. В этих же условиях определяли степень агрегации клеток крови новым высокочувствительным методом поверхностного плазмонного резонанса. Обнаружено повышение активности ферментов ДАО и ПАО при спинальных грыжах и снижение активности этих ферментов при злокачественных глиомах. Высказывается предположение о регуляторной роли этих ферментов в процессах пролиферативной активности лимфоцитов при нейрохирургической патологии, включающей глиомы головного мозга различной степени злокачественности.

Ключевые слова: полиамины, диаминооксидаза, полиаминооксидаза, глиомы, воспаление, лимфоциты.

Глиомы головного мозга — это инвазивные, злокачественные внутримозговые опухоли. Заболевание, как правило, заканчивается летальным исходом. Более 30 лет назад был обнаружен иммуносупрессивный статус при глиомах. Предположили, что обусловлено снижением пролиферативного потенциала лимфоцитами периферической крови в ответ на воздействие ФГА [1]. Развитие иммуносупрессии с последующей стимуляцией роста опухоли может происходить на различных этапах опухолевого процесса и во многом зависит от биологических особенностей опухоли. Однако наиболее благоприятный фон для экспансии многих клеток с супрессорной активностью создается в микроокружении опухоли, особенно при выраженной гипоксии. Современные данные, связанные с изучением иммуносупрессии, позволяют говорить о нескольких механизмах ее развития [2].

Один из таких механизмов может включать влияние ферментов окисления полиаминов (ПА): диаминооксидаза (ДАО) и полиаминооксидаза (ПАО), которые являются важными факторами в регуляции пролиферативной функции клеток организма при воспалении и опухолевом росте [3]. Повышение содержания полиаминов (ПА) регулируется этими ферментами путем окисления ПА в диальдегиды, которые способны подавлять клеточную пролиферацию, в частности скорость пролиферации лимфоцитов.

Опухоль — ассоциированное воспаление стимулирует рост и прогрессию злокачественных опухолей, в том числе и глиом головного мозга, формируя микроокружение опухоли [4—7]. Исследование опухоль-ассоциированного воспаления на системном уровне возможно при изучении процессов агрегации эритроцитов и адгезии лейкоцитов, которые реализуются, в первую очередь, при снижении уровня трансмембранного потенциала. Фитогемагглютинин (ФГА), который является мембраномодифицирующим препаратом и активатором пролиферативной активности лимфоцитов, может влиять на уровень трансмембранного потенциала (ТМП). Таким образом, одним из механизмов иммуносупрессии при глиомах головного мозга может стать взаимосвязь между падением ТМП на мембранах клеток крови с изменением уровня активности ферментов ДАО и ПАО, которые синтезируются клетками крови и могут снижать пролиферативный потенциал лимфоцитов.

Целью работы стало исследование механизма регуляции пролиферативной активности лимфоцитов ферментами ДАО и ПАО, синтезированными клетками периферической крови в процессе превращения лимфоцитов в бласты в тесте РБТЛ, при воздействии различных концентраций ФГА, которые могут изменять степень агрегации клеток крови при глиомах головного мозга.

Объект и методы исследования. Объектом исследования служили образцы крови, взятые натощак у больных с глиомами головного мозга различной степени злокачественности до лечения (239 чел.). Контрольной группой служили здоровые лица (52 чел.), а группой сравнения — больные со спинальными грыжами (в стадии хронического воспаления) до лечения (22 чел.).

Вначале определяли степень агрегации клеток крови новым высокочувствительным методом на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [8; 9]. Для определения показателей ППР при воздействии различных разведений ФГА гепаринизированную венозную кровь (гепарин, как известно, не влияет на степень агрегации клеток крови), взятую у больных до начала лечения, разделяли путем центрифугирования (3000 об/мин в течение 15 минут) на клеточные элементы крови и плазму. Исходный раствор ФГА (5 мг/5 мл воды) дополнительно разводили дейоннизированной водой в пределах концентрационного градиента от 10^{-1} до 10^{-5} раз. К одинаковым объемам клеток крови (200 мкл) добавляли по 20 мкл ФГА в указанных разведениях. Клеточные фракции использовали для определения сдвига минимума кривой ППР в градусах, отображающего степень агрегации клеток крови [9].

Данные представлены в процентах по отношению к показателям ППР, которые измеряли на образцах крови (без плазмы) с добавлением дейоннизированной воды (нулевая линия).

После измерения показателей ППР клетки крови (без плазмы) предварительно инкубировали с различными концентрациями препарата в течение 20 мин при температуре +37 °С. Контролем служил исходный раствор ФГА. Затем к клеткам крови с различными концентрациями ФГА добавляли питательную среду RPMI, антибиотик и проводили 72 часов культивирование при +37 °С согласно общепринятой методике РБТЛ.

Активности ферментов ДАО и ПАО, синтезированных клетками крови, определяли в культуральной среде в процессе превращения лимфоцитов в бласты при воздействии различных разведений ФГА спектрофотометрическим методом с о-дiazинидином в качестве хромогенного вещества [10].

Статистическую обработку полученных данных проводили в пакете “Statistica-5.5” с использованием непараметрических методов оценки данных. Оценивали правильность распределения признаков по каждому из полученных вариационных рядов, средние значения по каждому признаку, которые изучались, и стандартные отклонения [11]. Достоверность разницы значений между не зависимыми количественными величинами определяли с помощью *U*-критерия Мана-Уитни. Показатели представлены в процентах по отношению к общегрупповым показателям. Стандартизацию различных показателей проводили по формуле: $X_n - X\bar{X} / \sigma$, где X_n — индивидуальное значение; $X\bar{X}$ — среднее значение; σ — стандарт отклонения.

Результаты и их обсуждение. В группе здоровых лиц показатели степени агрегации клеток крови и активности ферментов ДАО и ПАО находятся в пределах нормы с незначительными отклонениями в зависимости от степени разведения ФГА. При снижении показателей ППР отмечается значительное снижение пролиферативной активности лимфоцитов. При этом активность ферментов ДАО и ПАО была также снижена. При повышении показателей ППР происходит повышение как уровня активности ферментов ДАО и ПАО, а количество бластов остается сниженным (рис. 1).

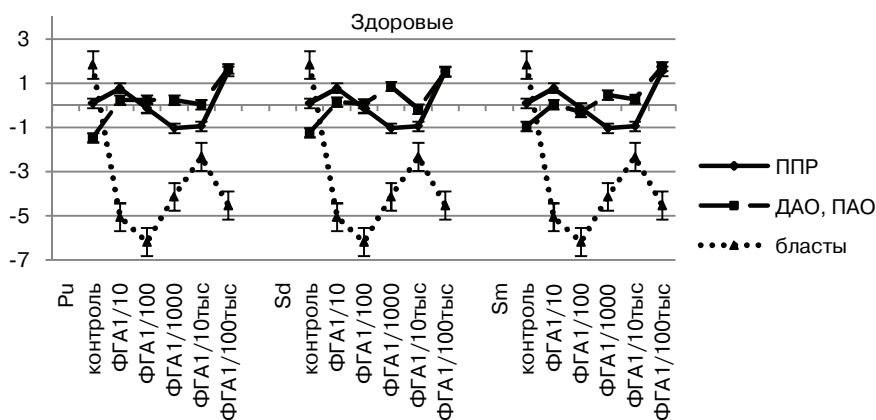


Рис. 1. Соотношение между показателями ППР, количеством бластов и активностью ферментов ДАО и ПАО у здоровых лиц при использовании различных разведений ФГА в тесте РБТЛ

В группе больных со спинальными грыжами при снижении показателей ППР отмечается одновременное повышение активности ферментов и количества бластов. Повышение показателей ППР совпадает со снижением показателей активности ферментов и количеством бластов (рис. 2).

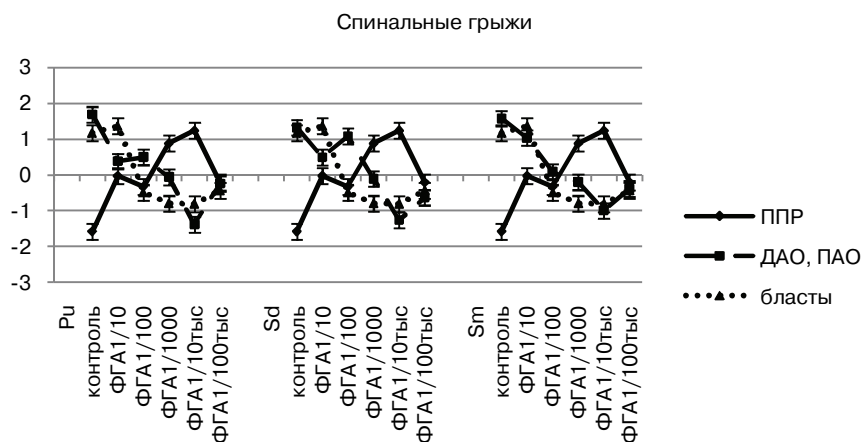


Рис. 2. Соотношение между показателями ППР, количеством бластов и активностью ферментов ДАО и ПАО у больных со спинальными грыжами при использовании различных разведений ФГА в тесте РБТЛ

При глиомах II ст. зл. снижение показателей ППР совпадает с уменьшением количества бластов и активности ферментов ДАО и ПАО. Увеличение показателей ППР совпадает со снижением количества бластов и увеличением активности ДАО и ПАО при окислении спермина. Активность ПАО при окислении спермина, наоборот, снижена (рис. 3).

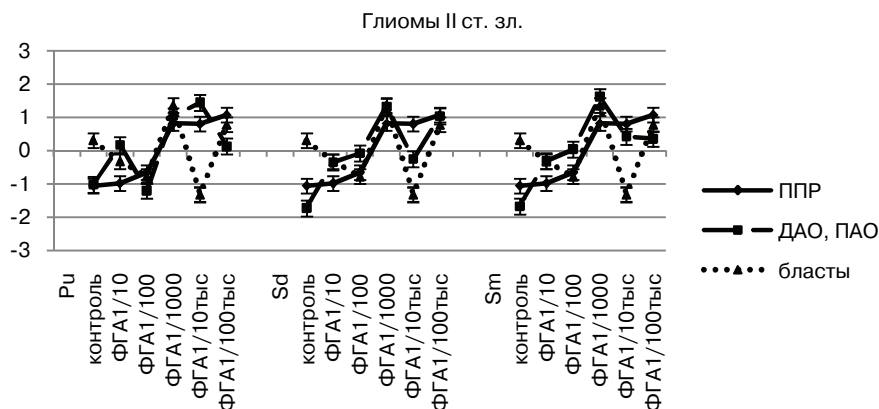


Рис. 3. Соотношение между показателями ППР, количеством бластов и активностью ферментов ДАО и ПАО у больных с глиомами II ст. зл. при использовании различных разведений ФГА в тесте РБТЛ

При глиомах III ст. зл. снижение показателей ППР сопровождается снижением активности ДАО и ПАО и повышением количества бластов. При повышении уровня показателей ППР количество бластов снижается одновременно с активностью ДАО и повышением активности ПАО (рис. 4).

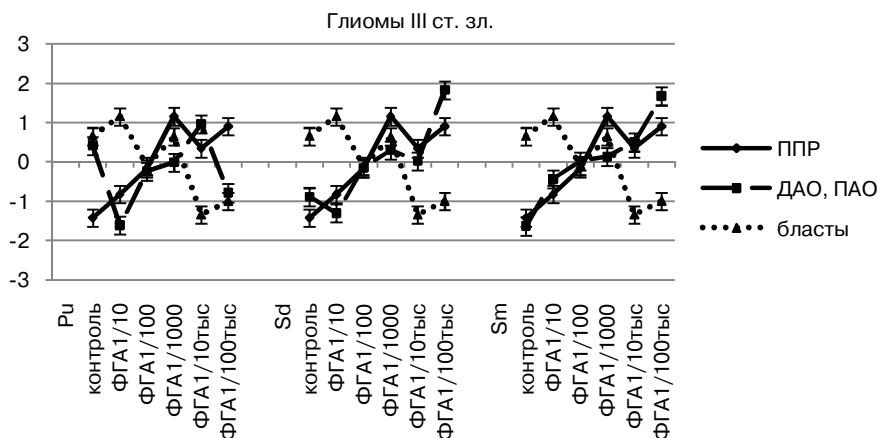


Рис. 4. Соотношение между показателями ППР, количеством бластов и активностью ферментов ДАО и ПАО у больных с глиомами III ст. зл. при использовании различных разведений ФГА в тесте РБТЛ

Заключение. Изменение активности ферментов ДАО и ПАО в культуральной среде, синтезированных клетками крови в процессе превращения лимфоцитов в бласты при воздействии различных разведений ФГА, свидетельствует об их регуляторной роли в процессах пролиферативной активности лимфоцитов при нейрохирургической патологии, включающей глиомы головного мозга различной степени злокачественности. Соотношения между уровнем снижения агрегации клеток крови и активностью ферментов ДАО и ПАО под воздействием различным разведений ФГА подчеркивает важную роль трансмембранного потенциала в пролиферативной активности лимфоцитов в процессах воспаления и при опухолевом росте.

Выводы.

1. Отличия исследуемых показателей в группах при хроническом воспалении (спинальные грыжи) и опухоль-ассоциированном воспалении (при глиомах III ст. зл.) на фоне повышения агрегации клеток крови и повышения количества бластов заключаются в повышении активности ферментов ДАО и ПАО при спинальных грыжах и снижении активности этих ферментов при злокачественных глиомах.

2. Отличия исследуемых показателей между доброкачественными глиомами (II ст. зл.) и злокачественными глиомами (III ст. зл.) состоят в том, что на фоне повышения уровня агрегации клеток крови и снижения активности ферментов ДАО и ПАО при доброкачественных глиомах количество бластов снижается, а при злокачественных глиомах их количество повышается.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Wood G.W., Morantz R.A. In vitro reversal of depressed T-lymphocyte function in the peripheral blood of brain tumor patients // J. Natl. Cancer Inst. — 1982. — **68**, N 1. — P. 27—33.
- [2] Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины — участники воспаления // Онкология. — 2009. — **11**, № 1. — С. 6—17.

- [3] *Березов Т.Т., Маклецова М.Г., Сяткин С.П. и др.* Роль обмена полиаминов в функциональной активности мозга в норме и при патологии // Журнал неврологии и психиатрии. — 2013. — 7. — С. 54—59.
- [4] *Filder I.J. et al.* The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis // J. Cell Biochem. — 2007. — 101, № 4. — P. 927—936.
- [5] *Лучник А.Н.* Общее звено в механизме самоподдержания злокачественного роста: синдром незаживающей раны // Онтогенез. — 2000. — 31, № 3. — С. 227—231.
- [6] *Шварцбург П.М.* Хроническое воспаление повышает риск развития эпителиальных новообразований, индуцируя предраковое микроокружение: анализ механизмов дисрегуляции // Вопросы онкологии. — 2006. — 52, № 2. — С. 137—144.
- [7] *Witz I.P.* The Tumor Microenvironment: The Making of a Paradigm // 5th International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy & Prevention. — Versailles, France, October 20—24, 2009. — 2 (Suppl 1): S9—S17.
- [8] *Bondeson K., Frostell-Karlsson A., Fagerstam L. et al.* Lactose Repressor-Operator DNA Interactions: Kinetic Analysis by a Surface Plasmon Resonance Biosensor // Analyt. Biochem. — 1993. — 214. — P. 245—251.
- [9] *Gridina N., Dorozinsky G., Khristosenko R. et al.* Surface Plasmon Resonance Biosensor // Sensors&Transducers. — 2013. — 149, Issue 2. — P. 60—68.
- [10] *Сяткин С.П., Галаев Ф.В.* Окисление путресцина, спермидина и спермина диаминоксидазой печени мышей // Биохимия. — 1977. — 42. — С. 1010—1013.
- [11] *Атраментова Л.А., Утевская Л.А.* Статистические методы в биологии. Учебник для студентов высших учебных заведений // Горловка: Лихтар, 2008.

REFERENCES

- [1] *Wood GW, Morantz RA:* In vitro reversal of depressed T-lymphocyte function in the peripheral blood of brain tumor patients // J. Natl. Cancer Inst. — 1982. — 68. — N1. — P. 27—33.
- [2] *Berezhnaya N.M.* The role of immune system cells in the microenvironment of the tumor. I. Cells and cytokines — inflammation participants // Oncology. — 2009. — 11. — № 1. — P. 6—17.
- [3] *Berezov T.T., Makletsova M.G., Syatkin S.P. etc.* The role of polyamines metabolism in the functional activity of the brain in health and disease // Journal of Neurology and Psychiatry. — 2013. — N 7. — P. 54—59.
- [4] *Filder I.J. et al.* The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis // J. Cell Biochem. — 2007. — Vol. 101. — № 4. — P. 927—936.
- [5] *Luchnik A.N.* Common link in the mechanism of self-sustaining growth of malignancy: syndrome of unhealed wounds // Ontogenesis. — 2000. — 31. — № 3. — P. 227—231.
- [6] *Shvartsburd P.M.* Chronic inflammation increases the risk of epithelial tumors, inducing precancerous microenvironment: analysis of dysregulation mechanisms // Problems of Oncology. — 2006. — 52. № 2. — P. 137—144.
- [7] *Witz I.P.* The Tumor Microenvironment: The Making of a Paradigm // 5th International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy & Prevention. — Versailles, France, October 20—24, 2009. — 2 (Suppl 1): S9—S17.
- [8] *Bondeson K., Frostell-Karlsson A., Fagerstam L. et al.* Lactose Repressor-Operator DNA Interactions: Kinetic Analysis by a Surface Plasmon Resonance Biosensor // Analyt. Biochem. — 1993. — 214. — P. 245—251.
- [9] *Gridina N., Dorozinsky G., Khristosenko R. et al.* Surface Plasmon Resonance Biosensor // Sensors & Transducers. — 2013. — 149. — Issue 2. — P. 60—68.
- [10] *Syatkin S.P., Galaev F.V.* Oxidation of putrescine, spermidine and spermine of diaminoxidized mouse liver // Biochemistry. — 1977. — N 42. — P. 1010—1013.
- [11] *Atramentova L.A., Utevskaia L.A.* Statistical methods in biology. Textbook for high school students // Gorlovka: Likhtar, 2008.

THE MECHANISM OF IMMUNOSUPPRESSION IN PATIENTS WITH BRAIN GLIOMA

V.A. Frolov, S.P. Syatkin

Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

**N.Ya. Gridina, N.G. Draguntsova,
O.I. Veselova**

State Institution "Institute of Neurosurgery of the Ukrainian NAMS"
Mayboroda str., 32, Kyiv, Ukraine, 04050

A.Yu. Chunikhin

Laboratory of optical methods for studying
Institute of Biochemistry n.a. A.V. Palladin of the Ukrainian NAS
Leonovitcha str., 9, Kyiv, Ukraine, 01601

V.P. Maslov, Yu.V. Ushenin

Lashkarev Institute of semiconductor physics of the Ukrainian NAS
Nauka pr., 41, Kyiv, Ukraine, 03083

The activity of diamineoxydase and polyamineoxydase which were synthesized by blood cells in the culture medium during the transformation of lymphocytes in the blasts when exposed to various dilutions of phytohemagglutinin have been determined in patients with cerebral gliomas of different degree of malignancy. Under these conditions, the degree of aggregation of blood cells was determined by new highly sensitive method of surface plasmon resonance. Increased activity of diamineoxydase and polyamineoxydase in spinal hernias and decreased activity of these enzymes in malignant gliomas has been found. The regulatory role of these enzymes in the processes of lymphocyte proliferative activity in neurosurgical pathology, including brain gliomas of different degree of malignancy, is suggested.

Key words: Polyamines, Diamine oxydase, polyamineoxydase, brain malignant gliomas, inflammation, lymphocytes.