

УДК .612.017.1: 616.831-006:611-018.1

ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СТОВБУРОВИХ ПУХЛИНИХ КЛІТИН У ПУХЛИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ*СТАНЕЦЬКА Д.М. ЛІСЯНИЙ О.М. ГНЕДКОВА І.О.*

Відділ нейроімунології ДУ «Інститут нейрохірургії НАМН»

Пухлини головного мозку, як правило, складаються з морфологічно різних клітин, які можна діагностувати за допомогою специфічних маркерів. При вивченні морфології і фенотипу пухлин головного мозку в останні роки було відкрито нову популяцію клітин, що отримала назву стовбурових пухлинних клітин (СПК) [1, 10, 14]. Подальше дослідження цих клітин дозволило їх детально вивчити та охарактеризувати. До їх властивостей відносять: а) необмежена здатність до самовідтворення, б) здатність до утворення пухлини при ортотопічній імплантації, в) генетичні ушкодження, г) здатність генерувати не пухлинні клітини, д) здатність до мультилінійного диференціювання [1, 6, 13, 14].

Незважаючи на чисельні здобутки у вивченні СПК, лишається відкритим питання їх походження. Існує думка, що можливі взаємні трансформації між СПК та нормальними нервовими клітинами (НСК) [10, 12]. Найбільш ймовірним джерелом СПК є НСК, оскільки в такому разі потрібно менше активуючих мутацій для запуску пухлинної прогресії, ніж для ектопічного вогнища проліферації [7, 10]. Крім цього, НСК існують в дорослому організмі відносно тривалий час, а значить можуть накопичувати мутації [3, 7, 10].

Панель специфічних для СПК маркерів ще достатньо не визначена. Відомо, що СПК, отримані з мультиформної гліобластоми, експресують різні маркери - CD133, CD105, CD90, Nanog, Oct 3/4, CXCR4 (CD184), NF (neurofilament protein), GAPDH (human glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase) [13]. Також, СПК експресують маркери, характерні для не пухлинних НСК, такі як астроцитарний маркер GFAP (glial fibrillary acidic protein), нестін, Sox-2, Misashi-1, Bmi-1 і не експресують ранні (Tuj1) і пізні (NeuN) нейрональні маркери і олігодендрогліальний маркер Olig-1 [4, 13].

Широко відомим маркером СПК вважається CD133 – молекула (prominin-1), яка є специфічною для стовбурових ембріональних клітин в той час її роль у виникненні та прогресуванні гліом до кінця не розкрита [5, 6, 9]. В злоякісних гліомах CD133⁺ клітини - це субпопуляція дрібних клітин з блакитною цитоплазмою, що здатні до об'ємного росту у вигляді округлих нейросфер. Інтракраніальна ін'єкція всього 100 CD133⁺ клітинами імунодефіцитним мишам призводить до розвитку пухлини із збереженням вихідного

фенотипу. У той же час ін'єкція 10⁵ CD133⁺ клітин не в змозі сформувати перевивну пухлину. Однак важко пояснити швидке зростання пухлини тільки за рахунок CD133⁺ клітин, оскільки більше половини онкохворих мають низький вміст CD133⁺ клітин [8, 9].

Імунні властивості та онкогенний потенціал дорослих пухлинних стовбурових CD133⁺ клітин залишається недостатньо вивченим. Вперше CD133⁺ клітини були виділені в 2003 році з гліальних пухлин людини. При тривалому культивуванні CD133⁺ клітин пухлини не утворюють нейросфери та «втрачають злоякісний фенотип» [3, 9, 11]. Надалі було з'ясовано, що CD133⁺ клітини пухлин здатні експресувати також нестін і віментин (неспецифічні маркери, що використовують для ідентифікації нейрональних прогеніторних клітин) [3, 4].

Слід сказати, що функції CD133 молекули ще недостатньо вивчені, невідома і динаміка її експресії на ембріональних тканинах та розподіл у різних по природі за ступенем злоякісності пухлинах [6].

Метою даної роботи було відпрацювання імунофлуорисцентного методу визначення клітин, які експресують CD133 молекулу за допомогою моноклональних анти CD133 антитіл та визначення присутності таких клітин в різних за злоякісністю пухлинах головного мозку.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом досліджень слугували різні пухлини головного мозку людини, що були отримані під час проведення операцій. Всього було досліджено 73 зразків, які включали, як доброякісні так і, злоякісні пухлини різного ступеня анаплазії. В роботі використовувався імунофлуорисцентний метод досліджень [2].

Фарбування препаратів для імунофлуорисцентних досліджень. Для забарвлення препаратів були використані первинні моноклональні специфічні CD133 антитіла (клон 17A6.1 фірми MILLIPORE USA), та вторинні антимишачі мічені флуорисцентною міткою діагностичні антитіла. Предметне скельце протирають спиртом, і маркують. На поверхню скельця наноситься відбиток-мазок з пухлини в один шар клітин. Підготовлений препарат підсушують на повітрі 7-10 хв. Мазок фіксують нанесенням 96% етанолу. Фіксовані зразки зберігали в темному міс-

ці при кімнатній температурі. На зафіксований мазок наносять 20 мкл протеїнового блокатора і витримують 7 хвилин. Зразки промивають буфером і підсушують. Наносять 30 мкл специфічних до CD133 антитіл. Препарати поміщають у вологу камеру, в термостаті на 40 хв не допускаючи підсихання розчину. Препарати промивають під проточною водою протягом 2 хв, промивають дистильованою водою і висушують на повітрі. На мазок наносять 30 мкл розчину антивідових мічених- FITC антитіл. Препарати поміщають у вологу камеру, в термостаті на 30 хв не допускаючи підсихання розчину. Препарати промивають під проточною водою протягом 2 хв, а потім відмивають дистильованою водою і висушують на повітрі. На висушений препарат наносять 10 мкл монтуючої рідини і покривають покривним скельцем.

Препарати досліджували на флюорисцентному мікроскопі фірми «Цейс» (Германія) з широкосмуговому та вузькосмуговому фільтрами під імерсійним об'єктивом (600), або під звичайним (400)). Отримані результати опрацьовували статистично за допомогою пакета програм "Statistica-6" з урахуванням критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В різному пухлинному матеріалі за допомогою використання специфічних антитіл були виявлені клітини, що експресували на своїй поверхні CD133 молекули, які як відомо є маркерами стовбурових клітин. Також в результаті спостережень було відзначено, що CD133⁺ клітини різняться не лише за кількісними характеристиками, але й за якісними, зокрема інтенсивністю

і характером специфічної флюорисценції. Відмінності були помічені і в морфологічних особливостях даних клітин (табл. 1).

Нами було встановлено, що частота виявлення клітин CD133⁺ клітин вища у більш злоякісних пухлинах, зокрема для гліобластом (4 ступень анаплазії) вона склала 75%. CD133⁺ клітини були виявлені у 100% досліджуваних зразках анапластичних (3ступеня анаплазії), натомість в фібрилярно-протоплазматичних астроцитомах вони виявились лише в 61,1% зразків. Також досить високою була частота виявлення CD133⁺ клітин в медулобластомах 85,7%, які також відносяться до злоякісних пухлин. Таким чином, у більш злоякісних пухлинах частіше виявляються CD133⁺ клітини.

Хоч деякі дослідники і ствержують, що частота виявлення CD133⁺ клітин не корелює з злоякісністю пухлин, однак достаменно відомо і те, що CD133⁺ СПК виявляють високу (в 4-5 разів більшу) інвазивну здатність у порівнянні з нестовбуровими пухлинними клітинами як *in vitro*, так і *in vivo*. Це, в свою чергу пов'язують з гіперекспресією різних протеїнів, зокрема, MMP-13, 14, 16, що відповідають за деградацію міжклітинного матриксу і полегшують клітинну інвазію. [Cheng L., 2011]. А відповідно збільшення чисельності клітин цієї субпопуляції в новоутворенні сприяє не лише пухлинному ангиогенезу, але й метастазуванню. Нами було помічено, що всередині однієї гістологічної групи пухлин, а саме пухлин гліального ряду, кількісний склад субпопуляції CD133⁺ клітин був різний. Отже, більша кількість та присутність CD133⁺ клітин в пухлині може сприяти прогресу онкологічного процесу.

Таблиця 1

Частота виявлення позитивних CD133 клітин в пухлинах головного мозку різного ступеня злоякісності та гістоструктури.

Гістологічний тип пухлин	CD133 ⁺		CD133	
	Абс.	%	Абс.	%
Гліобластома n=20	15	75	5	25
Анапластична астроцитома n=8	8	100	—	—
Фібрилярно-протоплазматична астроцитома n=18	11	61,1	7	38,9
Медулобластома n=7	6	85,7	1	14,3
Примітивна ектодермальна пухлина n=3	—	—	3	100
Менингіома n=7	5	71,4	2	28,6
Інші типи доброякісних пухлин n=10	4	40	6	60
Всього пухлин n=73 M±m	49	71,6±2,05	24	44.5±2,98

Також була помічена тенденція, що у доброякісних новоутвореннях паралельно з меншою частотою виявлення CD133⁺ клітин відмічається, ще й нижча їх кількісна представленість в пухлині. Натомість в злоякісних пухлинах з високим рівнем анаплазії, кількість CD133⁺ клітин була помітно високою. Найбільшими показниками відзначились гліобластоми, та медулобластоми (табл.), тоді як доброякісні пухлини, такі як протоплазматичні астроцитоми мали дуже

малу кількість CD133⁺ клітин у 54% і ні в одному випадку не було виявлення присутності цих клітин у великій кількості. На фото 1 показана типова флуоресцентна картина CD133⁺ клітин, які мають вигляд клітин невеликого розміру з ярко зеленою мембраною, у полі зору таких клітин більше 30, що дозволяє віднести цей зразок до пухлин з великим вмістом CD-133⁺ клітин ,які можуть бути стовбуровими пухлинними клітинами.

Таблиця 2

Кількісна характеристика експресії CD133⁺ клітин в позитивних зразках пухлин головного мозку

Гістологічний тип пухлин	Позитивні CD133 ⁺ зразки пухлин							
	±		+		++		+++	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Гліобластома n=15	5	33.3	4	26.7	5	33.3	1	6.7
Анапластична астроцитома n=8	2	25	5	62.5	1	12.5	—	—
Фібрилярно-протоплазматична астроцитома n=11	6	54.6	5	45.4	—	—	—	—
Медулобластома n=6	1	16.7	3	50	1	16.7	1	16.7
Менингіома n=5			3	60	2	40	—	—
Інші типи пухлин n=4	3	75	1	25	—	—	—	—
Всього пухлин n=49	17		21		9		2	
Сер. знач. M±m		34,1±2.46		44,9±1.46		17,1±1.52		11,7±0.62

Примітка: ± -1-2 клітини в полі зору; + -3-5 клітин в полі зору; ++ -10-15 клітин в полі зору; +++ -20-30% клітин в полі зору.

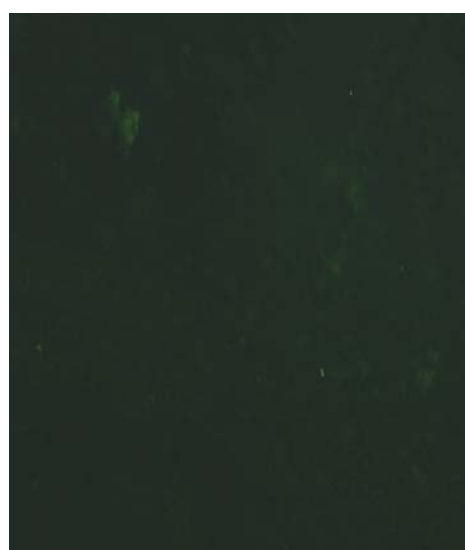
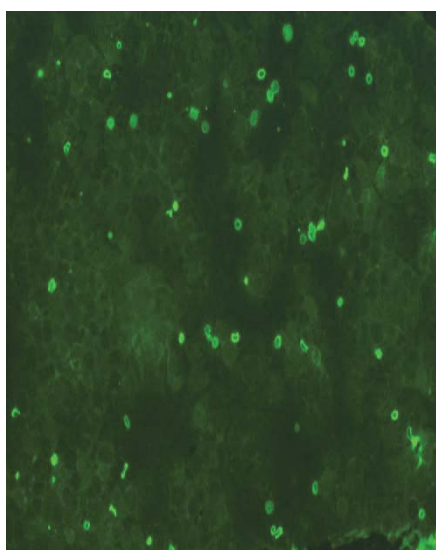


Рис.1 Медулобластома. Мікрофото імунофлуорисценції на вузьксмуговому фільтрі. CD133⁺ клітини світяться яскраво-салатовим; CD133⁻ – виглядають з слабо-зеленими контурами клітини. Зб.×400.

Отже, присутність у пухлинах великої кількості CD133⁺ клітин може вказувати на активне прогресування онкологічного процесу і бути одним з прогностичних критеріїв продовженого росту та метастазування таких пухлин.

Проведені дослідження направлені на виявлення імунофлуоресцентним методом у відбитках – мазках пухлин CD-133⁺ клітини, які пов'язують з пухлинними стовбуровими клітинами дозволили установити, що такі клітини характерні не лише злоякісним а й доброякісним пухлинам де вони виявляються у більш ніж половині спостережень. У кількісному відношенні CD133⁺ клітин виявляється значно більше у злоякісних пухлинах. Було також встановлено, що ці клітини присутні не лише у внутрішньо мозкових пухлинах гліального типу, а й у інших гістологічних типах пухлин мозку, що може свідчити, про можливу їх роль і розвитку цих пухлин. В той час як невелика їх кількість в тканині пухлини указує більш сприятливий доброякісний перебіг пухлинного процесу. В той же час згідно результатів інших дослідників наявність великої кількості CD133⁺ клітин пов'язують в основному із злоякісними пухлинами гліального ряду [5, 6], що узгоджується із отриманими нами даними.

Використання імунофлуоресцентного методу визначення CD133⁺ клітин за допомогою моноклональних антитіл є швидким та специфічним методом імунодіагностики наявності та кількості стовбурових пухлинних клітин у пухлинах, що може бути використане для прогнозування темпу росту пухлин та показів для вибору методу комбінованого променевого лікування.

ВИСНОВКИ

1. Проведені дослідження показали, що в різних пухлинах головного мозку з достатньо високою частотою виявляються клітини, що несуть на собі поверхневий маркер ембріональних стовбурових клітин CD133⁺ молекулу, яка може виявляється імунофлуоресцентним методом за допомогою моноклональних анти- CD133 антитіл.
2. Найбільшою частотою виявлення CD133⁺ клітин характеризуються злоякісні гліальні пухлини головного мозку високого ступеня анаплазії (75,7-100%) та медулобластоми (85,7%), у пухлинах нижчого ступеню анаплазії (таких як фібрилярно-протоплазматична астроцитомі), частота виявлення CD133⁺ клітин складала 61,1% .
3. Злоякісні пухлини головного мозку містили в собі значно більшу кількість CD133⁺ клітин ніж доброякісні, що свідчить про можливість використання їх як показника для прогнозування рецидивування та продовженого росту, а також для вибору тактики післяопераційного лікування.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Лисяний Н.И.* Стволовые клетки злокачественных глиом и их взаимодействие с клеточным окружением ткани мозга. / Лисяний Н.И., Лисяний А.Н. // — Український нейрохірургічний журнал, № 2, 2011 — 3-9 с.
2. *Пожарисский К.М.* Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / К.М. Пожарисский, Е.Е. Леенман // Архив патологии. – 2000. – № 5. – С. 3–11.
3. *Barraud P.* In vitro characterization of a human neural progenitor cell coexpressing SSEA4 and CD133 / Barraud P., Stott S., Mollgard K., Parmar M., Bjorklund A. // J Neurosci Res. 2007. – 85 (2). – P.250-259.
4. *Field M.* Embryonic Stem Cell Markers Distinguishing Cancer Stem Cells From Normal Human Neuronal Stem Cell Populations in Malignant Glioma Patients. / Field M., Alvarez A., Bushnev S., Sugaya K.// Clinical Neurosurgery. – 2010. – V.57. – P.151-159.
5. *He H.* Correlation between glioblastoma stem-like cells and tumor vascularization. / He H., Niu C.S., Li M.W. // Oncol. Rep. 2012. V.27 (1). P.45-50.
6. *Pallini R.* Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. / Pallini R., Ricci-Vitiani L., Montano N. et al // Cancer. 2011. V.59 (1). P.162-174.
7. *Pfenninger C.V.* CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. / C.V. Pfenninger, T. Roschupkina, F. Hertwig et al. // Cancer Res. – 2007. – 67 (12). P.5727-5736
8. *Ricci-Vitiani L.* Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. / Ricci-Vitiani L., Pallini R., Biffoni M. et al. // Nature. 2010. V.468 (7325). P.824-828.
9. *Sakariassen P.Q.* Cancer stem cells as mediators of treatment resistance in brain tumors: status and controversies. / Sakariassen P.Q., Immervoll H., Chekenya M. // Neoplasia. 2007. V.9 (11). P.882-92.
10. *Shiras A.* Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma / Shiras A., Chettiar S.T., Shepal V. et al. // Stem Cells. 2007. V.25 (6) P.1478-89.
11. *Soda Y.* Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. / Soda Y.,

- Marumoto T., Friedmann-Morvinski D. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V.108 (11). P.4274-4280
12. *Takebe N.* Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways / N. Takebe, P.J. Harris, R.Q. Warren, S.P. Ivy. // Nat. Rev. Clin. Oncol. – 2011. – №8. – P.97-106.
13. *Tomuleasa C.* Functional and molecular characterization of glioblastoma multiforme-derived cancer stem cells. / Tomuleasa C., Soritau O., Rus-Ciucă D. et al. // J. Buon. 2010. V.15 (3) P.583-591.
14. *Vescovi A.L.* Brain tumour stem cells. / Vescovi A.L., Galli R., Reynolds B.A. // Nat. Rev. Cancer. 2006. 6: P.425-36.
15. *Wang R.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. / Wang R., Chadalavada K., Wilshire J. et al. // Nature. 2010. V.468 (7325). P.829-833.

РЕЗЮМЕ

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Станецька Д.Н., Лисяний А.Н., Гнедкова І.А.

Отдел нейроиммунологии ГУ «Институт нейрохирургии НАМН»

Было проведено иммунофлюоресцентное исследование наличия стволовых опухолевых клеток (СОК) в опухолях головного мозга различной гистоструктуры с помощью CD133 моноклональных антител к маркеру стволовых клеток молекуле промени-

ну -1. Установлено, что CD133⁺ клетки более часто определяются у злокачественных глиальных опухолях и медуллобластомах, чем у доброкачественных опухолях. Злокачественные опухоли головного мозга содержали также большее количество CD133 клеток, что указывает на наличие в них большего количества СОК.

Наши исследования свидетельствуют о возможности использования метода иммунофлюоресцентного определения СОК для ускоренной диагностики, прогнозирования рецидивирования, а также для выбора тактики послеоперационного лечения

SUMMARY

IMMUNOFLUORESCENTS RESEARCH OF STEM TUMORS CELLS IN BRAIN TUMOR

Stanetscay D.N. Lisayniy A.N. Gnedcova I.A.

Department of neuroimmunology by Institute of neurosurgery NMAS

Immunofluorescent research of presence of stem tumours ccells was conducted in brain tumors different nature by CD133 of monoclonal antibodies to the marker of stem cells to the molecule of promenin -1. It is set that CD133⁺ cells more frequently determined at malignant gliomas tumours and meduloblastomas that what at of high quality tumours. Malignant brain tumors contained the greater amount of CD133 cells also, that specifies on a presence in them greater amount of stem tumours cells.

Our researches testify to possibility of the use the method of immunofluorescent determination of stem tumours ccells for speed-up diagnostics, prognostication of relapse, and also for the choice of tactic of postoperation treatment.

УДК 618.2/.5-022:616-006.52-08

РОЛЬ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ПРЕДОПУХОЛЕВОЙ ПАТОЛОГИИ ШЕЙКИ МАТКИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, В ПРОФИЛАКТИКЕ РЕЦИДИВОВ ДИСПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ

БОРИС Е.Н.^{1,2}

¹Кафедра акушерства, гинекологии и репродуктологии УГИР НМАПО имени П.Л.Шупика,

²Украинский государственный институт репродуктологии НМАПО имени П.Л.Шупика,

Во всех странах мира рак и предраковые повреждения шейки матки являются одной из основных медицинских, психологических и социальных проблем женщин. Среди злокаче-

ственных опухолей органов репродуктивной системы РШМ занимает третье место после рака молочной железы и рака эндометрия (рис. 1) [10,11,14].