

Н.И. Лисяный
И.А. Гнедкова
Л.Н. Бельская
Д.Н. Станецкая
В.М. Семенова
Т.А. Мальшева
А.А. Шмелева
М.А. Гнедкова

ГУ «Институт нейрохирургии
им. акад. А.П. Ромоданова
НАМН Украины», Киев,
Украина

Ключевые слова: стволовые
клетки глиомы, CD133, CD15,
лимфоциты, иммуносупрессия.

СОДЕРЖАНИЕ CD133⁺ И CD15⁺ СТВОЛОВЫХ НЕОПЛАСТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В ОПУХОЛЯХ И ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ГЛИОМАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ АНАПЛАЗИИ

Цель: изучить содержание стволовых клеток в глиомах головного мозга с учетом степени анаплазии и сопоставить его с процентным и абсолютным содержанием лимфоцитов в периферической крови больных. **Объект и методы:** изучены опухоли головного мозга 79 больных (материал получен во время оперативного вмешательства): 17 астроцитом фибриллярно-протоплазматических, 28 анапластических астроцитом, 34 глиобластомы. Фенотип опухолевых клеток исследовали иммунофлуоресцентным методом на проточном цитофлуориметре («Beckman Coulter», США). Фенотип опухолевых клеток определяли с помощью МкАТ CD133 («Millipore») к антигену CD133 и конъюгата МкАТ к антигену CD15 FITC («Becton Dickinson», США). Содержание лимфоцитов в периферической крови у больных (абсолютное и относительное) изучали общепринятыми методами. **Результаты:** установлено, что в глиомах содержатся два типа стволовых клеток — CD133⁺ и CD15⁺, их содержание увеличивается с повышением степени анаплазии глиомы. Отмечено также, что содержание CD15⁺ клеток в ткани каждого гистологического варианта глиомы было в 2 раза больше, чем CD133⁺. В параллельных исследованиях установлено достоверное снижение процентного и абсолютного содержания лимфоцитов в периферической крови больных при повышении степени анаплазии опухоли мозга. Наибольшее содержание CD133⁺ и CD15⁺ клеток отмечено при продолженном росте злокачественных глиом III–IV степени анаплазии, который сопровождался достоверно наименьшим содержанием лимфоцитов в периферической крови. Выказано предположение, что наличие рецепторов CD15 на опухолевых и иммунокомпетентных клетках обуславливает подавление иммунного ответа на клетки глиомы и развитие иммуносупрессии. **Вывод:** одним из механизмов развития иммуносупрессии при глиомах головного мозга может являться увеличение содержания и активация стволовых клеток глиом, хотя не исключен и другой механизм — развитие иммуносупрессии индуцирует активацию пролиферации стволовых клеток опухолей. Изучение взаимодействия стволовых клеток опухолей и иммунокомпетентных клеток будет способствовать разработке новых подходов к иммунотерапии.

ВВЕДЕНИЕ

Гипотеза стволовых клеток опухолей (СКО) постулирует наличие в различных новообразованиях популяции недифференцированных клеток, индуцирующих опухолевый рост [1].

СКО были выделены из различных опухолей, включая глиобластому [2]. Глиобластома — наиболее злокачественная опухоль мозга, содержащая различные популяции клеток с высокой способностью к инфильтративному росту, что делает невозможным ее тотальное удаление. Глиомы головного мозга характеризуются большой гетерогенностью, что определяет проблемы для химио- и таргетной терапии [3].

Маркерами стволовых клеток глиобластомы являются молекулы CD133, CD15, интегрин α6, LСAM. Ряд авторов также отмечают, что СКО различных типов новообразований экспрессируют CD44, CD24, CD20, эпителиальные молекулы адгезии ЕpCAM, TНУ, В5 (ABCВ5), что свидетельствует о многообразии их молекулярных маркеров [4]. Установлено, что СКО секретируют периостин (POSTN), содействующий привлечению инфильтрирующих опухоль макрофагов (tumor-associated macrophages — TAM). Необходимо подчеркнуть, что в опухолевом инфильтрате содержатся преимущественно CD11β моноциты по сравнению со «зрелым» фенотипом с экспрессией антигена CD14.

ТАМ секретируют IL6 и IL10 — промоторы пролиферации опухолевых клеток. IL6 способствует выживанию СКО. Считают также, что низкий уровень экспрессии антигенов МНСI и МНСII на СКО приводит к их ускользанию от иммунного контроля [5].

СКО похожи на нейрональные стволовые клетки, которые идентифицируют по образованию нейросфер в культуральной среде с минимальным содержанием ростовых факторов. Наиболее часто выявляют нейросферы в культуре опухолевых клеток у больных с продолженным ростом злокачественной глиомы. Нейросферы экспрессируют маркеры стволовых нейрональных клеток: нестин, CD133, β -тубулин, GFAP [4]. Дискутируется роль молекул CD133 в патогенезе и клиническом течении глиом головного мозга [6]. По мнению некоторых исследователей, экспрессия CD133 (PROM-1) на опухолевых клетках сопровождается коротким периодом ремиссии. Отмечена отрицательная корреляция между продолжительностью жизни больных и содержанием в опухоли CD133⁺ (позитивных) клеток [4]. Однако эти результаты были подтверждены не всеми исследователями. Так, K. Christensen и соавторы не отметили корреляции между содержанием в опухоли CD133⁺ клеток и ее продолженным ростом [7]. Другими авторами показано, что количество CD133⁺ клеток увеличивалось в зависимости от степени анаплазии клеток глиомы, а высокий уровень нестина сопровождался коротким временем ремиссии и выживаемости пациентов с глиомами. Содержание двух маркеров (CD133⁺ и нестина) указывало на неблагоприятный прогноз. Также отмечено, что содержание нестина увеличивается в зависимости от степени анаплазии глиомы [6].

Наибольшее содержание CD133⁺ клеток отмечали в пронеурональной и мезенхимальной группах глиобластом. В клетках глиом с низким содержанием CD133⁺ клеток выявляли содержание фермента изоцитратдегидрогеназы (IDH) [8]. В глиомах с высоким содержанием CD133⁺ (PROM^{high}) клеток была повышена экспрессия гена *PDGFRA*, амплификация которого сочеталась с низкой выживаемостью больных [8]. Показано, что 100 CD133⁺ клеток человека вызвали образование опухолей у экспериментальных животных, тогда как 100 000 CD133⁻ (негативных) клеток не индуцировали образование опухолей. Стволовые клетки получают как из CD133⁺, так и из CD133⁻ глиом. Установлены гетерогенность и возможный переход CD133⁺ клеток в CD133⁻ и наоборот. Стволовые клетки, изолированные из CD133⁻ опухолей, отличались другим фенотипом и показателями пролиферативной и инвазивной активности. Так, стимуляция CD133⁺ клеток сопровождалась образованием нейросфер, тогда как CD133⁻ клетки проявляли адгезивную активность.

R. Chen и соавторы показали, что стволовые клетки глиом CD133⁻ генерируют CD133⁺ прогениторные клетки. Тип 2 — CD133⁺ клетки генерируют CD133⁻ прогениторные клетки. Тип 3 — CD133⁻ клетки генерируют только CD133⁻ прогениторные клетки, что указывает на то, что экспрессия молеку-

лы CD133 не является абсолютным признаком наличия опухолевых стволовых клеток [9].

Примерно 40% глиобластом не содержат CD133⁺ клетки. Эти данные свидетельствуют, что злокачественные свойства клеток глиобластом определяют не только CD133, а и многие молекулы и факторы [8].

После проведения химиотерапии кармустином (BCNU) выживает и пролиферирует небольшая популяция CD133⁺ клеток. В этих клетках отмечают высокую экспрессию антиапоптотических генов и генов химиорезистентности — *BCRP*, *MDR*, *MRP* и *MGMT* [4].

После выделения CD133⁺ клеток из опухолей в них снижается экспрессия эмбриональных маркеров: Musashi-1, Nestin, Olig-2, Sox-2, — антигенов раннего развития мозга [6].

Антиген SiaLewis^x (SSEA-1, CD15) также считают маркером СКО. SSEA-1 относят к опухолеассоциированным антигенам, экспрессия которых коррелирует с плохим прогнозом [10]. Le^x-CD15 появляется впервые в эмбриогенезе на стадии 8 клеток, экспрессирован на нейронах взрослого мозга, на прогениторных и эмбриональных клетках при развитии нервной системы; на нейтрофилах и моноцитах [11]. Было показано, что SSEA Le^x-CD15 определялся на CD133⁻ клетках [11].

Цель данного исследования — установить содержание стволовых клеток, экспрессирующих маркерные антигены CD133 и CD15 в глиомах различной степени анаплазии, и сопоставить с содержанием лимфоцитов в периферической крови больных как интегральным показателем состояния иммунной системы.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучен материал опухолей головного мозга 79 больных, полученный во время оперативного вмешательства (17 астроцитом фибриллярно-протоплазматических, 28 анапластических астроцитом, 34 глиобластомы), и образцы периферической крови этих больных. Все пациенты дали информированное согласие на использование их биологического материала в исследовательских целях. Кусочки опухолевой ткани разделяли с помощью шприца с толстой иглой в стерильной среде Игла. Суспензию проводили через нейлоновый фильтр и дважды центрифугировали для дезагрегации и отмывания опухолевых клеток. Затем клетки разводили в полной среде RPMI в заданной концентрации.

Изучение фенотипа клеток проводили иммунофлуоресцентным методом на проточном цитофлуориметре («Beckman Coulter», США) по соответствующему протоколу. Фенотип опухолевых клеток определяли в исходной суспензии с помощью МКАТ к молекуле CD133 («Millipore») и конъюгатов МКАТ к CD15 FITC («Becton Dickinson», США). Абсолютное и относительное содержание лимфоцитов в периферической крови изучали общепринятыми методами.

Математическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Для оценки достоверности различий использовали t-критерии Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучено содержание СКО, выделенных из биоптического материала глиом головного мозга. Параллельно у больных исследовано содержание лимфоцитов в периферической крови как интегральный показатель состояния иммунной системы (табл. 1).

В глиомах различной степени анаплазии выявлено незначительное содержание стволовых клеток CD133⁺ и почти в два раза больше CD15⁺ клеток, отражающих наличие эмбрионального антигена SSEA1⁺. Установлено, что в изученных случаях содержание СКО увеличивалось в зависимости от степени анаплазии глиомы с достоверным отличием между глиомами I и IV степени анаплазии для антигена CD15 (см. табл. 1).

Увеличение количества клеток CD15⁺ (SSEA1⁺) было большим, чем CD133⁺, в клетках глиом различной степени анаплазии, что, по-видимому, можно связать с повышением экспрессии эмбрионального антигена не только в опухолевых клетках, но также на мембранах моноцитов и нейтрофилов, инфильтрирующих глиомы. Можно предположить, что увеличение SSEA1⁺ в опухоли и миелоидных клетках является одним из ранних этапов непосредственного взаимодействия опухоли и клеток иммунной системы. Полагают, что наличие антигенов SSEA1 на опухолевых и инфильтрирующих опухоль клетках подавляет их экспрессию на иммунокомпетентных клетках [11, 12].

Отмечено снижение содержания лимфоцитов, связанное со степенью анаплазии глиомы. Обращает на себя внимание факт, что наименьшее содержание лимфоцитов в периферической крови выявлено при продолженном росте глиом (10,6 ± 1,9%), то есть в клинической ситуации, для которой было характерным наибольшее содержание в опухоли стволовых клеток CD133⁺ и CD15⁺ (28,5 ± 3,5 и 54,9 ± 15,1% соответственно).

При сопоставлении высоких и низких значений показателей процентного содержания лимфоцитов у больных с глиомами III–IV степени анаплазии отмечено достоверное увеличение количества стволовых клеток в глиомах при достоверном снижении процентного и абсолютного содержания лимфоцитов в периферической крови (табл. 2).

Таким образом, клетки с маркерами стволовых выявляют в глиомах при снижении процента и абсолютного количества в периферической крови как лимфоцитов, так и гранулоцитов. Вероятно, в такой ситуации развивается общая и системная иммуносупрессия, что изменяет микроокружение опухоли и приводит к приобретению биохимическими процессами характеристик, свойственных более ранним онтогенетическим стадиям, что, в свою очередь, содействует активации клона СКО. Полученные факты наводят также на мысль, что угнетение лимфоцитарного ростка гемопоэза, снижение эффекторных функций лимфоцитов способствуют активации клоногенных свойств СКО мозга. Хотя возможен и другой механизм — активация и увеличение количества стволовых клеток в опухоли подавляют различные ростки гемопоэза и вызывают лимфоцитопению. Результаты исследований в определенной степени могут подтверждать мнение о существовании иммунологического контроля над ростом глиомы. Если при содержании лимфоцитов в периферической крови > 30% можно предполагать наличие такого контроля, то при снижении абсолютного и процентного содержания лимфоцитов до < 10%, вероятно, происходят глубокие нарушения в иммунологической регуляции пролиферации опухолевых клеток, что приводит к накоплению стволовых клеток в опухоли.

В связи с этим актуальным является дальнейшее изучение природы СКО и экспрессии различных рецепторов и маркеров на их поверхностных мембранах. На основе изучения связи иммунного статуса и содер-

Таблица 1
Содержание CD133⁺ и CD15⁺ стволовых клеток в злокачественных глиомах и лимфоцитов в периферической крови в зависимости от степени анаплазии глиомы

Гистологический вариант опухоли	Содержание стволовых клеток в опухолях, %		Содержание лимфоцитов в крови, %	Абсолютное содержание лимфоцитов в крови, × 10 ⁹ г/л
	CD133 ⁺	CD15 ⁺		
Глиома I–II (астроцитомы фибриллярно-протоплазматическая) (n = 17)	4,20 ± 2,37**	7,0 ± 2,9*.**	30,6 ± 5,7*.**	2,01 ± 0,45*.**
Глиома III (анапластическая астроцитомы) (n = 28)	7,98 ± 4,62**	12,4 ± 3,1**	27,0 ± 4,1**	1,11 ± 0,15*
Глиома IV (глиобластома) (n = 34)	9,83 ± 7,05**	14,5 ± 2,5*.**	20,4 ± 0,9*.**	1,46 ± 0,88
Продолженный рост глиомы (n = 5)	28,50 ± 3,5	54,9 ± 15,1*	10,6 ± 1,9	0,92 ± 0,11

*Различия между группами больных глиомами различной степени анаплазии, p < 0,001.

**Достоверность различий по сравнению с продолженным ростом глиомы, p < 0,001.

Таблица 2
Содержание CD133⁺ и CD15⁺ стволовых клеток в злокачественных глиомах у больных с высоким и низким процентным содержанием лимфоцитов в периферической крови

Гистологический вариант опухоли	Содержание стволовых клеток в опухолях, %		Содержание лимфоцитов в крови, %	Абсолютное содержание лимфоцитов в крови, × 10 ⁹ г/л
	CD133 ⁺	CD15 ⁺		
Глиомы III–IV (n = 4)	4,37 ± 2,1*	7,0 ± 5,9*	34,64 ± 4,5*	2,59 ± 0,49*
Глиомы III–IV (n = 7)	9,71 ± 5,2	12,9 ± 7,5	12,5 ± 2,9	1,11 ± 0,15
Продолженный рост глиомы (n = 5)	28,5 ± 3,5*	54,9 ± 15,1*	10,6 ± 1,9*	0,92 ± 0,11*

*Различия между группами больных статистически значимы, p < 0,001.

жания стволовых клеток в глиомах возможно определение критериев степени злокачественности глиомы и особенностей взаимоотношения глиомы и иммунной системы у конкретного больного для дальнейшей индивидуализации методов иммунотерапии.

ВЫВОДЫ

1. В глиальных опухолях головного мозга определяются стволовые клетки, экспрессирующие как CD133 (променин) — маркер нейрональных стволовых клеток, так и антиген CD15, который появляется на эмбриональных клетках и характерен для гранулоцитарного ростка гемопоэза.

2. Содержание стволовых CD133⁺ и CD15⁺ клеток при глиомах головного мозга повышается в 2,0–2,5 раза при увеличении степени анаплазии глиомы.

3. Развитие относительной и абсолютной лимфоцитопении в периферической крови больных сопровождается увеличением содержания стволовых клеток CD133⁺ и CD15⁺ в глиомах. Отсутствие лимфоцитопении в периферической крови характерно для больных глиомами с низким содержанием CD133⁺ CD15⁺ клеток в опухоли.

4. При продолженном росте злокачественных глиом содержание CD133⁺ клеток в опухоли увеличивается в 3 раза, а CD15 — в 4 раза по сравнению с первичными опухолями при двух- и трехкратном снижении содержания лимфоцитов в крови, что указывает на возможную связь между СКО и состоянием иммунной системы и наличием иммуносупрессивного действия стволовых клеток глиом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лисяный НИ, Лисяный АН. Стволовые клетки злокачественных глиом и их взаимодействие с клеточным окружением ткани мозга. Укр нейрохирург журн 2011; (2): 9–13.
2. Brescia P, Richichi Ch, Pehcci G. Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory? J Oncol 2012; e376894.
3. Лисяный НИ, Лисяный АН. Стволовые клетки злокачественных глиальных опухолей мозга. Онкология 2010; 12 (3): 229–36.
4. Dey M, Ulasov IV, Tyler MA, et al. Cancer stem cells: The final frontier for glioma virotherapy. Stem Cell Rev 2011; 7 (1): 119–29.
5. Zou W, Ke SQ, Huang Z, Flavahan W. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumor-associated macrophages and promotes malignant growth. Nat Cell Biol 2015; 17 (2): 170–82.
6. Dahlrot RH, Hansen S, Jensen SS, et al. Clinical value of 133 and nestin in patients with glioma: a population based study. J Clin Exp Pathol 2014; 7 (7): 3739–51.
7. Christensen K, Schroder HD, Kristensen BW. CD133 identifies perivascular niches in grade II–IV astrocytomas. J Neurooncol 2008; 90 (2): 157–70.
8. Olausson KH, Maire CL, Haidar S, et al. Prominin-1 (CD133) defines both stem and non-stem cells populations in CNS development and glioma. PLoS One 2014; 9 (9): e106694. doi 10.1371/journal.pone.0106694.
9. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. Cancer Cell 2010; 17 (4): 362–75.
10. Heimburg-Molinario J, Lum M, Vijay G, et al. Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine 2011; 89 (48): 8802–26.

11. Kumar A, Torii T, Ishino Y, Muraoka D. The Lewis^x-related α 1–3 fucosyltransferase, Fut 10, is required for the maintenance of stem cell populations. J Biol Chem 2013; 288 (40): 28859–68.

12. Yamamuro S, Okamoto Y, Sano E, Ochiai Y. Characterization of glioma stem-like cells from human glioblastomas. Int Oncol 2015; 47 (1): 91–6.

CONTENT OF NEOPLASTIC STEM CD133⁺ AND CD15⁺ CELLS IN TUMORS AND LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH GLIOMAS OF DIFFERENT LEVEL ANAPLASIA

N.I. Lisyany, I.A. Gnedkova, L.N. Belskaya, D.N. Stanetskaya, V.M. Semenova, T.A. Malysheva, A.A. Shmeleva, M.A. Gnedkova

Summary. Aim of this study was to investigate the content of stem tumor cells CD133⁺ and CD15⁺ in the gliomas depending on the degree of anaplasia tumor and to compare in percentage and absolute content lymphocytes in peripheral blood of these patients. **Objects and methods:** bioptic material of 79 gliomas: low level astrocytomas II grade — 17; anaplastic astrocytomas III grade — 28 and glioblastomas IV grade — 34 was studied. Phenotype of tumor cells was estimated by means of immunofluorescent method on cytofluorometr («Beckman Coulter», USA) according to protocol. Phenotype of tumor cells was determined by means of monoclonal antibody (mAb) to molecular CD133 («Millipore») and CD15 FITC («Becton Dickinson», USA). Ordinary methods were used for examine absolute and in percentage content of lymphocytes in peripheral blood of these patients. **Results:** the results showed two types cells CD133 and CD15 in gliomas. Their content increases with growth of level of anaplasia gliomas. The content of CD15 cells in every type of glioma was twice more than it was for CD133 cells. It was established a significant degree in percentage and absolute content of lymphocytes in peripheral blood with growth of the level anaplasia. The most of content of CD133 and CD15 cells was noted upon prolong growth of malignant gliomas (III–IV) which distinguished a significant level of all content of lymphocytes in peripheral blood. It was supposed the similarity of CD15 receptors tumor and immunocompetent cells causes the suppression of immune answer on tumor cells and the development of immunosuppression. **Conclusion:** one of the mechanism development of immunosuppression upon gliomas is the increase of content and activation of stem gliomas cells. On another side, the development of immunodepression may causes the activity of proliferation of stem cells too. The study of the interaction stem cells glioma and immunocompetent cells will be useful for working out the new approaches in immunotherapy.

Key Words: stem cells glioma, CD133, CD15, lymphocytes, immunodepression.

Адрес для переписки:

Гнедкова И.А.
04050, Киев, ул. Платона Майбороды, 32
ГУ «Институт нейрохирургии
им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины»
E-mail: irinagned@mail.ru

Получено: 10.12.2015