

КЛЕТКИ, ИЗОЛИРАНИ И КУЛТИВИРАНИ ОТ ГЛИОБЛАСТОМА МУЛТИФОРМЕ, ИМАТ ПРИЛИКИ С МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

**К. Тумангелова-Юзеир¹, Е. Найденов³, Е. Иванова-Тодорова¹, Ц. Младенова¹, С. Начев⁴,
М. Мурджева² и Д. Кюркчиев¹**

¹МДЛ по клинична лаборатория и имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“,
Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ – София

²Секция по молекулярна имунология, ИБИР, БАН

³Клиника по неврохирургия, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Катедра по неврохирургия, МУ – София

⁴Лаборатория по клинична патология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Катедра по неврохирургия, МУ – София

CELLS ISOLATED AND CULTURED FROM GLIOBLASTOMA MULTIFORME POSSESS SIMILARITIES WITH MESENCHYMAL STEM CELLS

**K. Tumangelova-Yuzeir¹, E. Naydenov³, E. Ivanova-Todorova¹, Ts. Mladenova¹, S. Nachev⁴,
M. Murdjeva² and D. Kyurkchiev¹**

¹Medico-Diagnostic Laboratory of Clinical Laboratory and Immunology, University Hospital “Sv. Ivan Rilski”,
Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, Medical University – Sofia

²Section of Molecular Immunology, Institute of Biology and Immunology of Reproduction,
Bulgarian Academy of Sciences

³Clinic of Neurosurgery; ⁴Laboratory of Clinical Pathology, University Multiprofile Hospital for Active Treatment
“Sv. Ivan Rilski”, Department of Neurosurgery, Medical University – Sofia

Резюме: Глиобластома мултиформе е най-често срещаният и най-агресивен мозъчен тумор, като средната преживяемост при това заболяване е 9-12 месеца. Съвременните изследвания показват, че туморът вероятно произхожда от популации на неврални стволови клетки, които са генетично увредени по начин, който ги трансформира в туморни стволови клетки. Тези клетки, наред с другите си свойства, могат да потискат имунната система. Мезенхимните стволови клетки са фибробластоподобни, мултипотентни и имат способност да се самообновяват и да се диференцират в мезодермални клетъчни линии. Известно е също така, че те имат имunosупресивен ефект, като действат както пряко върху ефекторните клетки, така и индиректно – върху клетки, регулатори на имунния отговор. При използването на методи на клетъчно култивиране, флоуцитометрия и ELISA нашите резултати показаха сходства между клетъчна култура от мултиплен глиобластом и мезенхимни стволови клетки по отношение на експресия на маркери и секреция на цитокини, от което може да се предполага и подобие в механизмите на супресия на имунната система.

Ключови думи: глиобластома мултиформе, имунна регулация, мезенхимни стволови клетки, неврални стволови клетки, туморни стволови клетки

Адрес за кореспонденция: Калина Тумангелова-Юзеир, МДЛ по клинична лаборатория и имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, бул. “Акад. Иван Гешов” 15, 1431 София, тел.: +359 2 8527046, e-mail: kullhem000@gmail.com

Summary: Glioblastoma multiforme is the most common and aggressive brain tumour. Recent observations suggest that gliomas can originate from neural stem cell populations which can be transformed in cancer stem cells. These cancer stem cells are able to induce suppression in the immune system. Mesenchymal stem cells are multipotent fibroblast-like cells and they have the possibility of self-renewal and differentiation in mesodermal cell lines. It is also known that mesenchymal stem cells have immunosuppressive effect affecting not only the effector cells of the immune system, but also cells which are known as regulators of the immune response. Using

methods for cell culturing, flowcytometry and ELISA our results demonstrated the similarities between mesenchymal stem cells and cellular cultures from glioblastoma regarding their marker expression and cytokine secretion which give us opportunity to speculate that the similarities regarding immunosuppressive function between both kinds of cells are also possible.

Key words: glioblastoma multiforme, immune regulation, mesenchymal stem cells, neural stem cells, cancer stem cells

Address for correspondence: Kalina Tumangelova-Yuzeir, MDL of Clinical Laboratory and Immunology, UMHAT "Sv. Ivan Rilski", 15 Acad. Ivan Geshov St., 1431 Sofia, tel.: +359 2 8527046, e-mail: kullhem000@gmail.com

ВЪВЕДЕНИЕ

Глиобластома мултиформе (ГБМ) е злокачествен, агресивен тумор, класифициран като степен IV по WHO (World Health Organisation). Средната преживяемост при това заболяване е 9-12 месеца [21]. Много усилия се полагат, за да се установи причината за възникване на ГБМ, да се опознаят процесите, които протичат в клетките му и да се открие ефективна терапия. Съвременните изследвания дават основания да се смята, че произходът на ГБМ е свързан с невралните стволови клетки (НСК), при които е възникнала мутация, както и с дерегулация на специфичните области, в които НСК се разполагат в ЦНС – субвентрикуларни зони. В резултат се формират туморни стволови клетки (ТСК), които притежават общи качества с НСК, като, самообновление, пролиферация, клетъчна преживяемост и диференциация. Те също така споделят с НСК експресията на някои маркери, като Nestin, CD133 и Sox-2 [1, 13, 24, 26], като в зависимост от условията на култивиране растат под формата на невросфери или адхерентни клетки. ТСК са клетки, които не само дават началото на ГБМ, но и са отговорни за неговия супресивен ефект върху имунната система [5, 6, 10].

Мезенхимните стволови клетки (МСК) са фибробластоподобни и мултипотентни стволови клетки. Установено е, че експресират МНС I, но не и МНС II, CD80, CD86, CD40, което ги определя като клетки с неимуногенен фенотип [9, 12]. Успоредно с това е добре известно, че тези клетки осъществяват имуносупресивни функции както директно върху ефекторните клетки на имунната система, така и непряко – чрез други имунорегулаторни клетки [3, 18, 27].

Нашите изследвания показаха прилики в морфологията, цитокиновата секреция и повърхностните маркери на клетъчни култури от ГБМ и МСК, което дава основание да се предположи, че сходството на клетките може би означава и подобие в механизмите на действие на двата вида клетки върху имунната система.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Пациенти: От Клиника по неврохирургия към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София, бяха предоставени материали от 4-има пациенти с хистологично доказана диагноза ГБМ, след предварително

подписано информирано съгласие. Материалите представляват свежа тъкан, получена при оперативно отстраняване на тумора.

Клетъчни култури: Изолирани бяха клетки от ГБМ като парче тъкан с размер 3-4 cm се хомогенизира механично, след което се инкубира на 37С за 1 час с колагеназа тип I (Sigma, USA). Сместа се прекарва през сито 70 µm (BD, USA). Така получената клетъчна суспензия беше посята в среда DMEM (PAA, Austria) +10%, FBS (PAA, Austria) + 20 ng/ml FGF и 20 ng/ml EGF (Sigma, USA), следвайки описания протокол [11, 23].

Флуоресцентна конфокална микроскопия: Клетъчни култури от ГБМ бяха култивирани до 1 пасаж, трипсинизирани (Trypsin, Sigma, USA) и изследвани за експресия на Nestin и Sox-2 със съответните специфични антитела (hSOX2 Affinity Purified Goat IgG и Anti-human Nestin Ab, R&D, USA) и втори антитела (Antigoat Alexa 594 и anti-mouse Alexa, Invitrogen, USA), съгласно с изискванията на фирмата, производител на антитела. За оцветяването на клетъчните ядра беше използван Hoechst (Sigma, USA).

Флоуцитометричен анализ: Клетъчни култури от ГБМ първи пасаж бяха трипсинизирани и изследвани за наличие на повърхностни маркери, CD90, CD73, CD105, CD29, CD45/CD34, CD133, CD44. Бяха използвани моноклонални антитела (BD, USA), като използвахме протокол, приложен от фирмата производител. Специфичното оцветяване беше отчетено с флоуцитометър FACSCalibur (BD).

Компютърни програми: За анализ на флоуцитометричните резултати беше използван софтуер CellQuest и WinMDI 2.

ELISA: Секреция на следните цитокини – IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFNγ, TNFα, от глиобластомните клетки беше изследвана чрез ELISA метод. Изследването беше извършено съгласно инструкциите на фирмата производител: Gen-Probe Diaclone SAS, France.

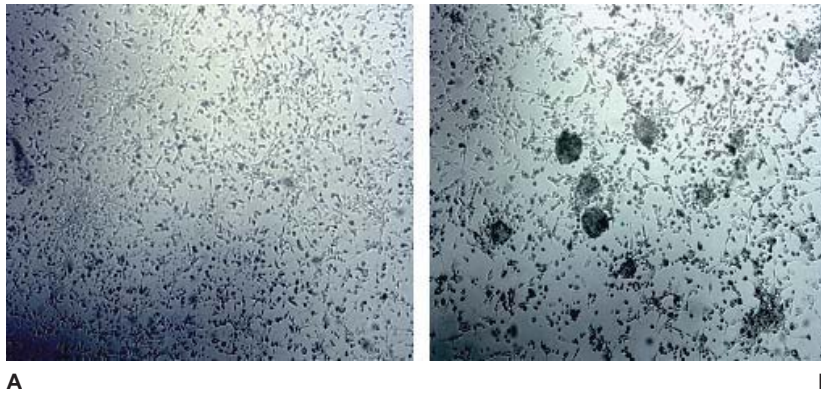
РЕЗУЛТАТИ

Клетките в три от отглежданите от нас култури от ГБМ растат адхерентно и показват морфологично сходство с МСК (фиг. 1А). В една от културите, въпреки че се отглежда при същите условия, клетките растат във вид на невросфери, наред с наличието на адхерентни клетки (фиг. 1Б).

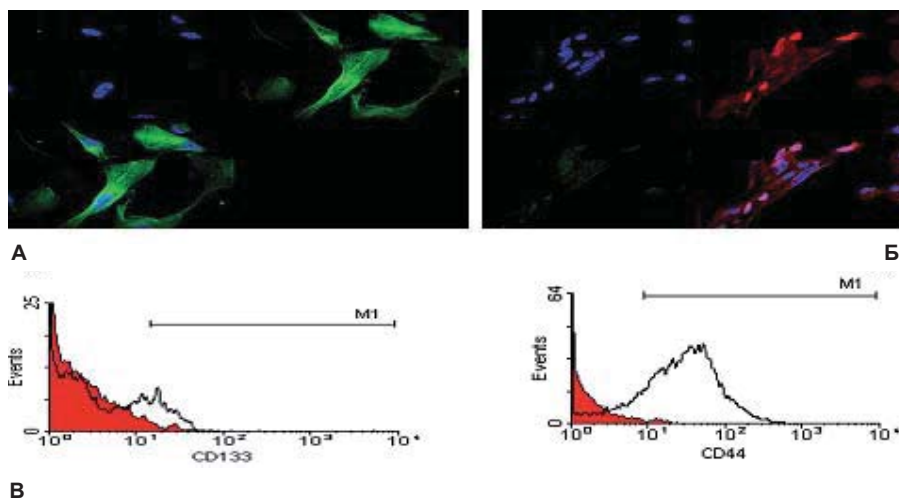
При изследване на маркери, характерни за НСК и ТСК (Nestin, Sox-2, CD133 и CD44), бяха получени положителни резултати за експресия на Nestin, Sox-2 и CD44 при всички култури (фиг. 2А, 2Б, 2Г). При изследването на CD133 получихме положителни резултати при две от клетъчните култу-

ри (фиг. 2В), а другите две бяха отрицателни (резултатът не е показан).

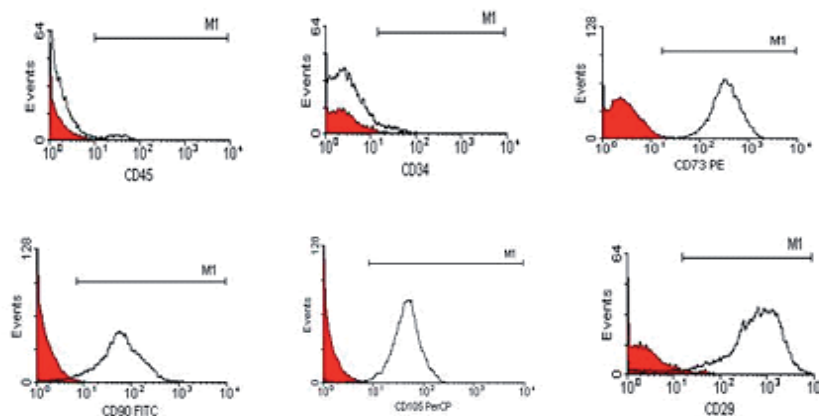
Установено беше, че ГБМ културите експресират на повърхността си маркери CD90, CD73, CD105, CD29, характерни за МСК, и също като МСК са отрицателни (или незначителен процент положителни) за CD45 и CD34 (фиг. 3).



Фиг. 1. Растеж на клетъчни култури от ГБМ. Три от културите растяха като адхерентни клетки – прилепнали, издължени, фибробластоподобни (А), а една – под формата на невросфери, наред с наличието и на адхерентни клетки (Б)



Фиг. 2. Експресия на маркери за неврални ТСК. Част от култивираните клетки от ГБМ експресират: А – нестин – фибрилно оцветяване в цитоплазмата, Б – Sox-2- петнисти отлагания в ядрата, В – CD133 експресия, Г – CD44 експресия



Фиг. 3. Експресия на маркери, типични за МСК, при клетъчни култури от ГБМ

Изследван беше и цитокиновият профил на културите от ГБМ, като те отново показаха сходство с МСК. От всички изследвани цитокини (IL-10, IL-12, IL-4, IL-6, TNF α , IFN γ) ГБМ, както и МСК секретират само IL-6 (табл. 1).

Таблица 1. Секреция на имунорегулаторни цитокини в супернатанти на клетки от ГБМ и МСК

Цитокини	ГБМ	МСК [16]
IL-10	-	-
IL-12	-	-
TNF α	-	-
TGF β	-	-
IL-4	-	-
IL-6	+++	+++

ОБСЪЖДАНЕ

При култивиране *in vitro* са описани два начина на растеж на глиобластомни клетки – под формата на невросфери (когато са култивирани с факторите EGF и FGF в безсерумни условия) или под формата на адхерентни клетки (когато са култивирани без фактори, но със серум). Като цяло се счита, че клетките, формиращи невросфери, са по-недиференцирани и по-близо до ТСК, отколкото частично диференцираните адхерентни култури [14, 19]. Получените при нашата експериментална постановка клетъчни култури от ГБМ бяха култивирани както с фактори, така и със серум, което вероятно обяснява, че три от четирите глиобластомни линии се развиваха като адхерентни клетки (фиг. 1А), а една – под формата на невросфери (фиг. 1Б). Адхерентните клетки показаха силна прилика с култивирани в предишни наши разработки МСК [15, 17] – прилепнали, издължени, фибробластоподобни. Подобни резултати са описани и от други изследователски групи както за МСК, така и за ГБМ [8, 30]. При изследване на специфичните за НСК и ТСК маркери установихме експресия на Nestin, Sox-2, CD133, и CD44, което е доказателство за произхода на клетките от ЦНС, както и за тяхната близост с НСК и ТСК. Nestin представлява интермедиерен филament, експресиран в НСК на бозайници по време на развитието на ЦНС. Той участва в изграждането на цитоскелета, клетъчната сигнализация и клетъчния метаболизъм на мултипотентни прогениторни клетки в ЦНС. Във възрастния организъм може да се експресира при някои патологични условия, като мозъчно увреждане, исхемия, възпаление и неопластични трансформации. При диференциацията си НСК намаляват експресията на Nestin и го заменят с други интермедиерни филamentни белтъци, като GFAP [20, 28]. Sox-2 е

транскрипционен фактор, експресиран в мултипотентни НСК в ранните етапи на невралното развитие. Все повече проучвания показват, че Sox-2 може да се използва като маркер за тумори с глиален произход, както и като универсален маркер за туморни стволови клетки [25]. CD133/Prominin е повърхностен клетъчен маркер, експресиран от нормални НСК, както и от хемопоеични стволови клетки, а също и при някои туморни клетки. Експресията му, особено заедно с Nestin, се асоциира с по-лоша прогноза за пациенти с малигнени глиоми. В литературата са описани глиобластоми, които при култивиране са или положителни, или отрицателни за CD133 експресията, като невросферите са особено типични за наличието на CD133 [2, 4]. Нашите резултати показаха експресия на този маркер при два от четирите култивирани глиобластоми, като единият беше именно растящият под формата на невросфери (фиг. 3В). Наличието на CD44 е един от маркерите за характеризиране на ТСК. Принадлежи към фамилията на клетъчни адхезионни молекули и играе ключова роля в механизма на туморна инвазия и метастазизиране. CD44 е свръхекспресиран в ГБМ, като блокирането му спира растежа на ГБМ и ги прави по-чувствителни към цитотоксични медикаменти *in vivo* [7]. Характерно е, че МСК също експресират CD44 [29]. Наличието на маркери, типични за НСК и ТСК (Nestin, Sox-2, CD133, CD44), все още не дава основание култивираните от ГБМ клетки да се характеризират като туморни стволови клетки, тъй като, за да се направи този извод, са необходими и други доказателства. Факт е обаче, че тези клетки показаха еднаква експресия с основните маркери, описани [29] при мезенхимните стволови клетки, резултат, който потвърждава данните, получени и от други изследователи [22]. Наред с това култивираните клетки от ГБМ показаха липса на секреция на IL-4, IL-10, TNF α , IL-12, IFN γ и налична секреция на IL-6, също както и мезенхимните стволови клетки [18].

ИЗВОДИ

Нашето проучване демонстрира успешно изолиране и култивиране на клетки от злокачествен глиобластом, носещи маркери, типични за туморни стволови клетки, въпреки че това не е достатъчно за категоричното им определяне като такива. Наличието на сходна морфология, еднакви повърхностни маркери и еднаква цитокинова секреция ни дава основание да предположим, че между мезенхимните стволови клетки и клетките, изолирани от ГБМ, би следвало да се очакват и сходни имуносупресивни механизми.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Beier, C. P. et al. The cancer stem cell subtype determines immune infiltration of glioblastoma. – *Stem Cells Dev.*, **21**, 2012, № 15, 2753-2761.
2. Beier, D. et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. – *Cancer Res.*, **67**, 2007, № 9, 4010-4015.
3. Ben-Ami, E., S. Berrih-Aknin et A. Miller. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune disease. – *Autoimmunity Reviews*, **10**, 2011, 4 10-415.
4. Brescia, P. et al. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. – *Stem Cells*, **31**, 2013, № 5, 857-869.
5. Cho, D. Y. et al. Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. – *Cell Transplant.*, **22**, 2013, № 4, 731-739.
6. Di Tomaso, T. et al. Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. – *Clin. Cancer Res.*, **16**, 2010, № 3, 800-813.
7. Dimov, I. et al. Glioblastoma multiforme stem cells. – *Scientific World Journal*, **11**, 2010, 930-958.
8. Djouad, F. et al. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. – *Nat. Rev. Rheumatol.*, **5**, 2009, 392-399.
9. Djouad, F. et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. – *Stem Cells*, **25**, 2007, 2025-2032.
10. Facchino, S. et al. BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. – *J. Neurosci.*, **30**, 2011, № 30, 10096-10111.
11. Galli, R. et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. – *Cancer Res.*, **64**, 2004, № 19, 7011-7021.
12. Gebler, A., O. Zabel et B. Seliger. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. – *TRMOME*, **741**, 2011, 1-7.
13. Gursel, D. B. et al. Glioblastoma Stem-Like Cells-Biology and Therapeutic Implications. – *Cancers (Basel)*, **3**, 2011, № 2, 2655-2666.
14. Hong, X., K. Chedid et S. N. Kalkanis. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. – *Int. J. Oncol.*, **41**, 2012, № 5, 1693-1700.
15. Ivanova-Todorova, E. et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared with bone-marrow derived mesenchymal stem cells – *Immunology Letters*, **126**, 2009, 37-42.
16. Ivanova-Todorova, E. et al. Conditioned medium from adipose tissue derived mesenchymal stem cells induces CD4+FoxP3+ cells and increases IL-10 secretion. – *J. Biomed. Biotech.*, 2012.
17. Kyurkchiev, D., E. Ivanova-Todorova et S. Kyurkchiev. Effect of progesterone on human mesenchymal stem cells. Burlington, Academic press, Vol. 87, 2011, 217-234.
18. Kyurkchiev, D. et al. Differences between adipose tissue derived mesenchymal stem cells and bone marrow derived mesenchymal stem cells as regulator of the immune response. Springer, Vol. 10, 2013, 71-84.
19. Lee, J. et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. – *Cancer Cell*, **9**, 2006, № 5, 391-403.
20. Matsuda, Y. et al. Nestin: neural stem/progenitor cell marker in brain tumors. 2013.
21. McLendon, R. E. et J. N. Rich. Glioblastoma Stem Cells: A Neuropathologist's View. – *J. Oncol.*, 2011, 1-8.
22. Nakahata, A. et al. Glioblastoma cancer stem cell: Basis for a functional hypothesis. – *Sci. Res.*, **2**, 2012, № 3, 122-131.
23. Pistollato, F. et al. Isolation and expansion of regionally defined human glioblastoma cells in vitro. – *Curr. Protoc. Stem. Cell Biol.*, 2011, Chapter 3, Unit 3 4.
24. Sanai, N., A. Alvarez-Buylla et M. Berger. Neural stem cells and origin of gliomas. – *N. Engl. J. Med.*, **353**, 2005, № 8, 811-822.
25. Schiffer, D. et al. On the origin and growth of gliomas. – *Anticancer Res.*, **30**, 2010, 1977-1998.
26. Schiffer, D. et al. Glioblastoma cancer stem cells: Basis for a functional hypothesis. – *Stem Cell Discovery*, **2**, 2012, № 3, 122-131.
27. Shi, Y. et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. – *Cell Research*, **20**, 2010, 510-518.
28. Veselska, R. et al. Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. – *BMC Cancer*, **6**, 2006, 32.
29. Warnke, P. C. et al. A clinically-feasible protocol for using human platelet lysate and mesenchymal stem cells in regenerative therapies. – *J. Cranio-Maxillo-Facial Surg.*, 2012, 1-9.
30. Yuan, X. et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. – *Oncogene*, **23**, 2004, № 58, 9392-9400.