

*Медицински университет – София*  
*Медицински факултет*  
*Катедра по клинична лаборатория и клинична*  
*имунология*

---

Калина Динкова Тумангелова-Юзеир

**Изолиране, култивиране и характеристика на  
клетки от Глиобластома мултиформе**

*Дисертационен труд*

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Научен ръководител :            Доц. Д-р Доброслав Кюркчиев, дмн  
Период на изготвяне:            март 2012 – февруари 2016  
Докторска програма:            „Имунология”

София, 2016 г.

## Съдържание:

Списък на по-често използваните съкращения: .....	4
1. Въведение .....	6
2. Литературен обзор .....	8
2.1. Глиобластома мултиформе.....	8
2.1.1. Обща характеристика.....	8
2.1.2. Клинични симптоми .....	8
2.1.3. Локализация и диагностика на глиобластома мултиформе .....	9
2.1.4. Произход и видове глиобластома мултиформе.....	9
2.1.5. Терапевтични подходи .....	13
2.2. Туморни стволови клетки.....	15
2.3. ГБМ и имунна система.....	23
2.3.1. Имунен отговор в ЦНС – особености .....	23
2.3.2. Основни имуносупресивни механизми, използвани от ГБМ .....	26
2.3.3. Тумор асоциирани макрофаги (TAM) .....	27
2.3.4. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs).....	29
2.3.5. Дендритни клетки .....	30
2.3.6. Tregs.....	32
2.4. Мезенхимните стволови клетки (МСК) .....	34
2.5. ГБМ инфилтриращи ефекторни клетки.....	37
2.5.1. Т-клетки .....	37
2.5.2. NK- клетки .....	38
2.6. Секреция на имуносупресивни фактори – цитокини.....	40
2.7. ГБМ и транскрипционни фактори (Stat1 и Stat3).....	57
2.8. Заключение.....	61
3. Цел и задачи.....	63
4. Материали и методи .....	64
4.1. Изследвани лица и биологичен материал.....	64
4.2. Фенотипизиране на имунни клетки, инфилтриращи ГБМ .....	65
4.2.1. Изолиране .....	66
4.2.2. Маркиране на клетки, изолирани от ГБМ със специфични антитела и флуоцитометричен анализ .....	66
4.3. Имунохистохимично изследване на хистологични срези от ГБМ за експресия на Stat3 ...	67
4.3.1. Tissue MicroArray .....	67

4.3.2. Нарязване, депарафиниране и антигенно възстановяване .....	69
4.3.3. Имунохистохимично оцветяване .....	69
4.4. Култивиране на клетки, изолирани от ГБМ .....	70
4.4.1. Използвани среди за клетъчно култивиране .....	72
4.5. Изследване експресията на маркери, характерни за ТСК, от ГБМ клетъчни култури .....	72
4.5.1. Изследване чрез флоуцитометрия .....	73
4.5.2. Изследване чрез флуоресцентна конфокална микроскопия .....	74
4.5.3. Изследване на GFAP чрез RT-qPCR .....	75
4.6. Изследване способността за клоногенност на клетъчни култури от ГБМ .....	75
4.7. Молекулярно-генетични методи за определяне на генна експресия на Stat 1 от клетъчни култури от ГБМ. Сравнителен количествен PCR в реално време (quantitative Reverse-Transcription PCR) .....	76
4.8. Изследване цитокиновата секреция на ГБМ клетъчни култури чрез Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	81
4.9. Изследване способността на активация на Т-лимфоцити, изолирани от здрави донори след култивирането им в среда от ГБМ клетъчни култури и стимулация с фитохемаглутинин .....	87
4.9.1. Изолиране на PBMCs .....	87
4.9.2. Стимулация на PBMCs с фитохемаглутинин .....	88
4.9.3. Статистически методи .....	89
4.9.4. Изследване на наличието на IL-10 в супернатанта от PBMC, изолирани от здрави донори след култивиране в среда от ГБМ клетъчни култури .....	89
4.10. Изследване на маркери, характерни за мезенхимни стволови клетки при ГБМ клетъчни култури .....	89
4.11. Изследване на способността за адипогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ .....	90
4.12. Изследване на способността за остеогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ .....	91
4.13. Изследване експресията на progesterone induced blocking factor (PIBF) при ГБМ клетъчни култури .....	92
4.13.1. Флоуцитометрично изследване .....	92
4.13.2. Флуоресцентна конфокална микроскопия .....	92
4.13.3. q RT-PCR метод .....	92
5. Резултати и обсъждане .....	94
5.1. Имунотипизиране на имунни клетки, инфилтриращи ГБМ .....	94
5.1.1. Антиген представящи клетки, инфилтриращи ГБМ .....	94
5.1.2. Изследване на NK и Т клетки, инфилтриращи ГБМ .....	97

5.2. Експресия на Stat3 от ГБМ .....	103
5.3. Резултати получени при клетъчно култивиране на клетки, изолирани от ГБМ .....	105
5.3.1. Култивиране на клетки, изолирани от ГБМ за получаване на адхерентни клетки ....	106
5.3.2. Култивиране на клетки, изолирани от ГБМ за получаване на невросфери .....	106
5.3.3. Култивиране на клетки, изолирани от ГБМ за получаване на наш „междинен“ модел .....	107
5.4. Преминаване на един в друг вид клетъчен растеж при ГБМ клетъчни култури .....	110
5.5. Експресия на маркери, характерни за ТСК и НСК, от клетъчни култури от ГБМ.....	112
5.5.1. Резултати получени чрез флоуцитометричен метод на изследване.....	113
5.5.2. Резултати, получени чрез конфокална микроскопия .....	116
5.5.3. Резултати, получени чрез qRT-PCR изследване .....	118
5.6. Потенциал за самообновление на ГБМ клетъчни култури .....	123
5.7. Експресия на Stat1 в клетъчни култури от ГБМ .....	124
5.8. Експресия на маркери, характерни за МСК от клетъчни култури от ГБМ .....	126
5.9. Остеогенна и адипогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ .....	128
5.10. Секреция на цитокини при ГБМ клетъчни култури .....	133
5.11. Изследване на влиянието на супернатанта от ГБМ клетъчни култури върху активацията на РВМС .....	135
5.12. РВФ експресия в клетъчни култури от ГБМ.....	140
5.13. Култивирани по наш модел клетки, изолирани от ГБМ – ТСК или МСК? .....	145
6. Заключение. ....	153
7. Изводи .....	156
8. Приноси .....	157
8.1. Приноси с потвърдителен характер .....	157
8.2. Приноси с оригинален характер .....	157
9. Публикации във връзка с дисертационния труд .....	159
10. Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд .....	159
Библиография .....	161

## Списък на по-често използваните съкращения:

- АК – адхерентни клетки  
АПК – антиген представящи клетки  
ГБМ – глиобластома мултиформе  
ДК – дендритни клетки  
ИС – имунна система  
КМБ – кръвно-мозъчна бариера  
МГ – малигнен глиом  
МСК – мезенхимни стволови клетки  
НС – невросфери  
НСК – неврални стволови клетки  
СЗО – Световна Здравна Организация  
ТСК – туморни стволови клетки  
ЦНС – централна нервна система
- bFGF – basic fibroblast growth factor  
CCL-2 – chemokine (C-C motif) ligand 2  
CCR-2 – C-C chemokine receptor type 2  
CD – cluster of differentiation  
CSF – colony stimulating factor  
CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4  
EGF – epidermal growth factor  
EGFR – epidermal growth factor receptor  
FBS – foetal bovine serum  
GFAP - glial fibrillary acidic protein  
ICAM – intercellular adhesion molecule  
IDO - indoleamine-2 3-dioxygenase  
IL – interleukin  
MDSCs - myeloid derived suppressor cells  
MGMT - O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase  
MIC-1 monokine induced by gamma interferon (MIG),  
MICA/B – Major histocompatibility complex class I-related chain A/B  
MMP – matrix metaloproteinase

NKG2DL – NKG2D ligand  
PBMC – peripheral blood mononuclear cells  
PD-L 1,2 – programmed death-ligand 1,2  
PDGF – platelet-derived growth factor  
PDGFR – platelet-derived growth factor receptor  
PECAM – Platelet endothelial cell adhesion molecule  
PGE2 – prostaglandin E2  
PHA - phytohemagglutinin  
PIBF – progesterone induced blocking factor  
SDF-1 – stromal cell-derived factor 1  
Sox-2 – sex determining region Y-box 2  
Stat – signal transducer and activator of transcription  
TGF $\beta$  – Tissue growth factor  $\beta$   
Tregs - регулаторни Т-лимфоцити  
VEGF – Vascular endothelial growth factor  
VEGFR - Vascular endothelial growth factor receptor

## 1. Въведение

Глиобластома мултиформе (ГБМ) е хистологично хетерогенен и силно инвазивен първичен мозъчен тумор, който съгласно класификацията на Световната здравна организация (СЗО) се определя като астроцитом степен IV на малигненост. Неконтролируема клетъчна пролиферация, апоптоза, инвазия и ангиогенеза са сред биологичните процеси, които правят този тумор едновременно агресивен и труден за третиране, способен да добие големи размери преди проява на симптоматика. Съвременните терапевтични методи се състоят от хирургична резекция, последвана от радио- и химиотерапия. Въпреки агресивното лечение, преживяемостта на пациенти с тази диагноза е средно 12-15 месеца по данни от научната литература, а за България – е едва 8 месеца по непубликувани данни на Клиника по неврохирургия, УМБАЛ “Св. Иван Рилски“.

В нервната система на възрастен човек са установени неврални стволови клетки (НСК), които могат да се самообновяват, да пролиферират и да се диференцират до различни типове зрели клетки на ЦНС. Последните проучвания върху патогенезата на високостепенните глиални тумори показват, че натрупването на различни неблагоприятни фактори води до трансформацията на НСК или свързани с тях прогениторни клетки в така наречените туморни стволови клетки (ТСК). Счита се, че именно те дават начало на ГБМ, избягвайки механизмите, които контролират пролиферацията и програмираната клетъчна диференциация. Има все повече данни, че ТСК допринасят за устойчивостта на тези тумори към стандартните методи на лечение. Системата, която осигурява защитата на организма, както от външни патогенни агенти, така и от собствени клетки и фактори, водещи до увреждане, е имунната система (ИС). Когато тя функционира нормално, възникналите ТСК би трябвало да бъдат унищожени. Литературните данни показват, че ГБМ супресира, както локалния, така и системния имуноен отговор. В микросредата на глиобластома мултиформе са открити множество клетки, индуциращи имуноен толеранс. Част от тях са толерогенни антиген представящи клетки (microglia/macrophage, дендритни клетки (ДК), перицити), а други са пряко ангажирани в процеса на имуносупресия като myeloid derived suppressor cells (MDSCs) и регулаторни Т-лимфоцити (Tregs). Секрецията на цитокини и други имуносупресивни фактори като interleukin-6 (IL-6), IL-10, vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) и др, както и експресията на

имуносупресивни молекули като indoleamine-pyrrrole 2,3-dioxygenase (IDO), programmed death-ligand 1,2 (PD-L1,2), NKG2D ligand (NKG2DL) , galectin-1 от клетките на тумора и заобикалящите го клетки също модулират имунния отговор и благоприятстват туморогенезата. Все още не е изяснено, дали ТСК участват в наблюдаваната имунна супресия, или съществува първична имunosупресия, която благоприятства по-нататъшното развитие на тумора чрез тях.

Дисертационният ми труд, изготвен с помощта и в сътрудничество с Клиника по неврохирургия към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Лаборатория по клинична патология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Секция по молекулярна имунология, ИБИР, БАН и Тъканна банка „БулГен“ включва изследване инфилтрацията на периферна и централна зона на ГБМ от клетки на имунната система, както и изследване на тъканни срези от тумора за експресия на Stat3. Основен топик на дисертацията е създаване на първични клетъчни култури от ГБМ и тяхното изследване за маркери характерни за туморни стволови клетки (CD133, Nestin, CD44, Sox-2, GFAP) и мезенхимни стволови клетки (CD34, CD45, CD73, CD90, CD105). Също така, в клетъчни култури от ГБМ, изследвахме експресия на транскрипционния фактор Stat1, както и експресията на имунорегулаторния протеин, известен като Progesterone induced blocking factor (PIBF). Предмет на нашия интерес беше и установяването на цитокиновата секреция от клетъчните култури и въздействието ѝ върху периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMC) на здрави хора.

Сериозността на проблема, фактът, че все още не е постигнат достатъчен успех в опознаването на начините, по които ГБМ влияе и потиска имунната система и липсата на успешна терапия ни дава основание да смятаме, че нашата работа има своя принос за допълване на знанията посветени на този проблем. Получените от нас резултати потвърждават, допълват и обогатяват информацията, публикувана в световната литература на тази тема. Освен това следва да се отбележи, че подобни на описаните изследвания, до момента не са се извършвали в нашата страна.

## 2. Литературен обзор

### 2.1. Глиобластома мултиформе

#### 2.1.1. Обща характеристика

Глиобластома мултиформе (ГБМ) е най-често срещаният и най-малигният от астроцитните тумори. Той представлява 12-15% от всички интракраниални неоплазми и 50-60% от всички астроцитомии. Засяга главно мозъчните хемисфери при възрастни, а при деца – мозъчния ствол и гръбначният мозък. Името „multiforme” произхожда от първите хистопатологични описания на този тумор, характеризиращ се с дифузна инфилтрация на прилежащи и отдалечени мозъчни структури, хетерогенна клетъчна структура, слабо диференцирани, анапластични глиални клетки, митотична активност, микроваскуларна пролиферация и некрози. В повече от 90% от случаите ГБМ възниква *de novo*, като първичен тумор, диагностициран след кратък период на клинична симптоматика. Първичните ГБМ тумори по правило възникват при по-възрастни пациенти (средна възраст 62г.), докато вторичните, получени вследствие на засилена малигнизация на по-нискостепенни астроцитомии - дифузен астроцитом (степен II според Световната Здравна Организация-СЗО) и анапластичен астроцитом (степен III по СЗО), се проявяват при по-млади пациенти (средна възраст около 45г.) При вторично възникналите глиобластоми времето необходимо за прогресия силно варира – от няколко месеца до повече от 10 години. ГБМ се среща по-често при мъже, като съотношението е 1,28:1. (*Lassman 2006; Louis et al. 2007; Greenfield's Neuropathology 2008; Wen and Kesari 2008*)

#### 2.1.2. Клинични симптоми

Обикновено пациентите страдащи от ГБМ, проявяват неспецифични неврологични симптоми, главоболие, дезориентация, промяна на личността и епилепсия. Класическото главоболие, което е показателно за нарастнало вътречерепно налягане, е по-изострено сутрин и дори може да събуди пациента. Когато се изостри, главоболието може да бъде съпроводено от гадене, повръщане и вратна ригидност, които се дължат на съпровождащия тумора мозъчен оток. (*Greenberg et al. 1999; Greenfield's Neuropathology 2008; Wen and Kesari 2008*)

### 2.1.3. Локализация и диагностика на глиобластома мултиформе

ГБМ обикновено засяга субкортикалното бяло вещество на мозъчните хемисфери, като туморни инфилтрати често се наблюдават в прилежащата кора и базалните ганглии. Често е и разпространението през corpus callosum към контралатералната хемисфера – създава се картина на билатерална симетрична лезия („пеперудоподобна глиома“). Типичният начин на разпространение е по протежение на периваскуларните пространства, като инвазия на лумена на кръвоносните съдове не е наблюдавана. (Louis et al. 2007; Greenfield's Neuropathology 2008)

За локализация и диагностика на ГБМ обикновено се използват магнитен резонанс и компютърна томография. Изследванията, извършени чрез описаните методи показват хетерогенна, увеличаваща се маса, придружена от едем. ГБМ често имат централна област съставена от некротизираща тъкан и по-изразен около-туморен едем в сравнение с по-ниско степенните астроцитомии. Магнитният резонанс е особено полезно изследване с оглед на възможността да установи локализацията на тумора и неговата евентуална близост до говорните и моторни центрове, като по този начин може да се планира по-добре предстояща операция. Друго инструментално изследване е протонномагнитнорезонансна спектроскопия, чрез което се засичат нивата на метаболитите в изследваната тъкан и това дава възможност за диференцирането на тумора от некрозите или бенигнените лезии. Позитронно-емисионната томография е техника, която използва изотопи като 18F-fluorodeoxyglucose, 18F-fluoro-L-thymidine и 11C-methionine и тя е ценна в диагностицирането и мониторинга за отговора на организма на прилаганата терапия. (Wen and Kesari 2008) Дефинитивна диагноза при това заболяване се поставя чрез хистологична диагностика на материал от тумора, получен при оперативното му отстраняване.

### 2.1.4. Произход и видове глиобластома мултиформе

Класическа представа е, че ГБМ възниква от астроцити при дедиференциацията им вследствие на възникнали мутации. Считало се е, че при тези условия те придобиват качества, характерни за невралните стволови клетки (НСК) и стават дисфункционални и неконтролируеми по отношение на техния растеж. Ето защо ГБМ е включен към групата на астроцитните тумори в класификацията на СЗО, като основно се е делял на първичен и вторичен в зависимост от начина по който възниква, както е описано по-

горе. (Louis et al. 2007; Greenfield's Neuropathology 2008; Agnihotri et al. 2011) Не са установени съществени разлики по отношение на локализацията и фенотипа на двата типа ГБМ.

Глиобластома мултиформе се състои от хетерогенна смес съставена от глиобластомни и привлечени от тумора клетки. Той е хетерогенен и по отношение на своите хистопатологични, радиографични и генетични характеристики и след доста изследвания проведени в тази област е установено, че астроцитната компонента не е единствената ангажирана във формирането на тумора. (Singh et al. 2003; Galli et al. 2004; Singh et al. 2004; Sanai et al. 2005; Bao et al. 2006; Eramo et al. 2006, Schiffer et al. 2012) Още през 1863г. Рудолф Вирхов забелязва, че има сходства между ембрионалните и злокачествените клетки. По-късно наличието на клетки проявяващи свойства, характерни за стволовите клетки е описано многократно при различни видове малигнени образувания, включително и при мозъчни тумори. (Reya et al. 2001) В ЦНС при възрастни са открити НСК, които са мултипотентни и притежават свойствата самообновление и диференциация в основните видове клетки на ЦНС – неврони, олигодендроцити и глиални клетки. Те се разполагат в специални области – ниши в субвентрикуларната зона на хемисферите, както и в субгрануларната зона на хипоталамуса. Условиата в нишите контролират важни за НСК свойства, свързани с тяхното оцеляване и пролиферация (самообновление). (Schiffer et al. 2012; Goffart et al. 2013) В нишите НСК са йерархично подредени. Специфичната микросреда в нишите е съставена от невробласти (А-клетки), НСК в покой (В-клетки) и клетки, засилващи прехода (С-клетки), заобиколени от епендимални клетки. (Mirzadeh et al. 2008; Shen et al. 2008). Активно делящите се НСК, както и клетките в покой се регулират от пролиферативни и антипролиферативни сигнали. (He et al. 2005) Като най-достоверна хипотеза за възникване на ГБМ днес се счита „Cancer stem cells hypothesis”. Според тази хипотеза cancer stem cells (тук наричани туморни стволови клетки -ТСК) дават началото и са отговорни за растежа, рецидивирването и устойчивостта на ГБМ на химио- и радиотерапия. (Bachoo et al. 2002) Смята се, че ТСК произлизат от НСК, при които е възникнала мутация и “матурационен арест”, като тази трансформация се свързва и с условия, водещи до дисрегулация в нишите, в които са разположени НСК. Това предположение се потвърждава и от опити с канцерогенни вещества с вирусен или химически произход – поставени в субвентрикуларната зона те предизвикват формиране на тумор много по-често, отколкото, ако се въведат в непролиферативен регион като кортекса например. (Agnihotri et al. 2011) Доста изследвания съобщават за

наличие на човешки цитомегаловирус в клетките на ГБМ, като също показват, че той преференциално инфектира НСК. Днес се приема, че вероятно този вирус модулира НСК и се явява промотор за възникване на малигнени мозъчни тумори. (*Jacques et al. 2010; Price et al. 2013*)

Други факти, за които се смята, че потвърждават „Cancer stem cells hypothesis” са споделяните от НСК и ТСК основни характеристики като самообновление, диференциация, експресия на маркери и сигнални пътища. Някои от маркерите характерни за НСК и експресирани от ТСК са Nestin, Notch1 и 2, Musashi1 и 2, CD133, sex determining region Y-box 2 (Sox-2), Glial fibrillary acidic protein (GFAP), CD44 и др. (Таблица1) Според „Cancer stem cells hypothesis” малигнените тумори притежават клетъчна йерархия, съставена от ТСК, прогениторни клетки и крайно диференцирани клетки. (*Gursel et al. 2011*) ТСК могат да се определят като бавноделящи се, но силно туморогенни клетки, които са на върха на йерархията сред популациите от туморни клетки. Счита се, че те дават началото на останалите туморни популации и са основно свързани с туморогенността и устойчивостта на терапия при ГБМ. (*Galli et al. 2004; Sanai et al. 2005; Lee et al. 2006; Eramo et al. 2006; Wang et al. 2007; Bleau et al. 2008; Pollard et al. 2009*)

Таблица 1 Сравнение на основни характеристики при НСК и ТСК.

	НСК	ТСК
Самообновяване	Да	Да
Диференциация	Да	Да
Мултипотентност	Да	Да
Сигнални пътища	подобни	
Генетични алтерации	подобни	
Nestin	Да	Да
GFAP	Да/не	Да/Не
Sox-2	Да (главно цитоплазмено)	Да (главно ядрено)
CD133	Да	Да (дискутабилно)
CD44	Да	Да

Както теорията за астроцитна дедиференциация, така и Cancer stem cells hypothesis могат да намерят своето потвърждение чрез наблюдаваните две форми на ГБМ.

Известно е, че ГБМ може да възникне, както от неврални стволови клетки, така и от астроцити и това вероятно отговаря на разликата между първичен и вторичен ГБМ. (*Dai et al. 2001*) Интересно е да се отбележи, че първичният и вторичният ГБМ могат да се разграничат по експресията на мутантната isocitrate dehydrogenase 1-2 (IDH1-2), която се наблюдава при анапластичен и дифузен астроцитом, олигодендроглиом и вторичен ГБМ, но не и при първичен ГБМ. (*Balss et al. 2008; Hartmann et al. 2009*)

Съществува и друга теория, известна като теория за клоална еволюция, според която в туморната маса се извършва естествен подбор и оцеляват само най-адаптираните клонове клетки. Изучавайки процесите на произход и развитие на ГБМ, много автори доказват, че ТСК не са единствено отговорни за устойчивостта му. Съществува кооперация между клетъчните популации в тумора, която е от ключово значение за развитието му. (*Nowell 1976; Bonavia et al. 2011*) Този механизъм за туморна прогресия и поддържане на хетерогенността на тумора е наречен интерклоална кооперативност. (*Lyons et al. 2008*) Този модел предполага, че при някои клонове в ГБМ настъпват онкогенни мутации, в резултат на които микросредата придобива про-онкогенен фенотип, характеризира се със секреция на фактори, подпомагащи съседните клонове. Едно интересно заключение от тази теория е, че дори малка група, фенотипно различни клетки, може да има огромно въздействие върху останалата част от популацията, например чрез предизвикване на растеж и метастазирание. (*Inda et al., 2010*)

Други изследвания разделят ГБМ на 4 типа, дефинирани според геномни характеристики, преживяемост, възраст на пациентите и отговор при лечение – класически, пронеурален, неврален и мезенхимен. (*Ohgaki et al. 2009; Hayden et al. 2010; Kuehn et al. 2010; Verhaak et al. 2010*) Изследователи от Cancer Genome Atlas Network не отхвърлят възможността четирите типа ГБМ да се развиват като резултат от различна етиология и диференционни пътища от сходен вид изходни клетки (например НСК), но предлагат и алтернативна гледна точка – развитие на различните видове от различни родоначални клетки. Като доказателство за наличието на няколко различни популации от туморогенни клетки те сочат наличието на по-диференцирани от НСК прекурсорни клетки със способност за самообновление, експресиращи маркери, характерни за НСК, както и platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) или epidermal growth factor receptor (EGFR). (*Galli et al. 2004; Verhaak et al. 2010*) Генният анализ, който провеждат показва, че пронеуралният тип ГБМ се асоциира с олигодендроцитни, невралният – с олигодендроцитни, астроцитни и невронни, а класическия и мезенхимният – с астроглиални прекурсори. (*Verhaak et al. 2010*) Други

изследователски центрове, провеждащи изследвания върху мишки, също потвърждават, че при генетични увреди не само НСК, но и по-диференцирани глиални клетки и дори крайно диференцирани неврални и глиални клетки могат да се върнат до по-незряло състояние и да дадат начало ГБМ. (*Bachoo et al. 2002; Liu et al. 2009; Friedmann-Morvinski et al. 2012*) Генетичните изследвания на ГБМ показват, че туморните клетки проявяват едновременно множество генетични промени, което води до идеята, че мутациите може би се акумулират в НСК и прогениторите, като по този начин някой от тях дават начало на туморна формация. (*Krivtsov and Armstrong 2012*) Изказано е също предположение, че вида на изходните клетки определят развитието, йерархичните връзки и в крайна сметка типа ГБМ, който ще се формира. Изходния вид клетки изглежда влияе върху клиничните характеристики и резистентността при лечение, което може да се използва при прогнозиране на хода на болестта и планирането на лечение. (*Sharma et al. 2010; Lei et al. 2011*)

От изложеното до тук става ясно, че са необходими допълнителни изследвания, които да хвърлят яснота върху произхода на този тумор и да дадат предимство на една от хипотезите.

#### **2.1.5. Терапевтични подходи**

В клетките на ГБМ е установено натрупване на генетични аберации и дисрегулация на сигналните пътища за растежни фактори. Най-често се наблюдава увеличена експресия на рецепторите за epidermal growth factor (EGF) и platelet-derived growth factor (PDGF). В туморните клетки връзката между лигандите и техните рецептори подава сигнал, който активира транскрипционните програми за пролиферация и инвазия. Наблюдава се също повишена експресия на VEGFR (vascular-endothelial growth factor receptor), която се свързва със засилена ангиогенеза. Клетъчните пътищата, задействани от EGFR, PDGFR и VEGFR, играят важна роля за нормалното развитие на нервната система, тъй като подпомагат пролиферацията на невралните стволови клетки, но от друга страна отключени и дисрегулирани в туморните клетки, те осигуряват устойчивост на тумора срещу прилаганата терапия. (*Greenberg et al. 1999; Lassman 2006; Wen and Kesari 2008*)

Конвенционална терапия:

При поставяне на диагноза ГБМ, конвенционалната терапия включва хирургическа резекция, радиотерапия и/или химиотерапия. Пълното хирургическо отстраняване на

този тумор на практика е невъзможно поради дифузния му инфилтративен характер. Оперативната намеса има предимно палиативна цел: да облекчи симптомите, предизвикани от нарастващата туморна маса. Радиотерапията е основен метод на лечение и прилагането ѝ след хирургическа резекция увеличава продължителността на живот на пациентите от 3-4 месеца до 7-12 месеца.

Химиотерапията предизвиква все по-голям интерес, но засега допринася слабо за повишаване на преживяемостта при пациенти с ГБМ. За химиотерапевтично лечение обикновено се използват темозоломид (темодал), кармустинови импланти и др. Оказва се обаче, че туморните клетки са устойчиви на този вид терапия. Това се дължи на система от ензими, коригиращи ДНК. Важен коригиращ ензим е O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT). Смята се, че метилирането на промотора на този ензим подтиска гена му като по този начин се намалява „поправката“ на ДНК и се повишава чувствителността на туморните клетки към темозоломид. Проведени изследвания върху пациенти с ГБМ, при които MGMT промотора е метилиран (45% от MGMT промотора) и са приемали темозоломид, е установена средна преживяемост увеличена до 21,7 месеца. Средната преживяемост на пациенти, при които промотора работи нормално и които също са третирани с темозоломид, е 12,7 месеца. Въпреки тези данни на този етап темозоломид се използва много често без да се изследва статуса на MGMT промотора.

Понастоящем, за съжаление стандартното лечение на пациенти с ГБМ на практика изпълнява предимно палиативна роля, облекчавайки причинените от тумора симптоми.

Имунотерапия:

Локалната и системната имуносупресия, свързана с ГБМ е добре документирана и включва намаляване на броя и активността на Т лимфоцитите (*Roszman et al. 1991; Rapp et al. 2006*), повишаване на броя на имуносупресивните регулаторни Т-клетки (*Fecci et al. 2006*), засягане на антиген представящата функция от дендритните клетки (ДК) и други антиген представящи клетки (АПК) (*Ogden et al. 2006*), експресия на дефектни рецептори от моноцитите (*Woiciechowsky et al. 1998; Ogden et al. 2006*) и промяна в цитокиновата секреция на имунокомпетентните клетки. (*Woiciechowsky et al. 1998; Zou et al. 1999*) Описаните ефекти на тумора върху имунната система и биологичните му характеристики на практика осигуряват безпрепятственото развитие и растеж на ГБМ и обясняват кратката преживяемост на пациентите с тази диагноза.

Имунотерапията може да се раздели на два вида: активна и пасивна имунотерапия. При първият тип се цели да се предизвика имунен отговор срещу туморни антигени, докато

при втория на пациента се инжектират *in vitro* култивирани и активирани клетки или специфични молекули (напр. антитела), насочени срещу антигени на туморните клетки. (Choi et al. 2009; Vauleon et al. 2010) При активната имунотерапия се използват антигенни източници като интактни туморни клетки, протеинов лизат от тумора, туморна иРНК, синтетични пептиди и др. Антигените могат да се приложат самостоятелно или в комбинация с различни адюванти, но най-често се прилагат представени върху дендритни клетки, които имат ключова роля при инициацията на имунна реакция. (Parajuli and Sloan 2004; Vauleon et al. 2010; Xu et al. 2014)

Първият тип клетки, използвани за пасивна терапия, са лимфоцит-активирани килъри, състоящи се от различни популации Т- и НК-клетки, които се прилагат интрацеребрално. (Vauleon et al. 2010) Друг потенциален имунологичен метод за лечение е прилагането на стимулирани цитотоксични Т лимфоцити, които се прилагат интрацеребрално и венозно. Той се базира на установения факт, че локалното повишение на CD3+/CD8+ Т лимфоцитите корелира с повишена преживяемост на пациенти с ГБМ. (Kitahara et al. 1987; Tsurushima et al. 1999; Tsuboi et al. 2003, Gustafson et al. 2010)

Основен подход за имунотерапия при ГБМ в наши дни е дендритно-клетъчната ваксина, използвана в няколко европейски центъра. Принципът на ваксината се базира на изолиране на моноцити от периферна кръв на пациента, диференцирането им в дендритни клетки, и култивирането им с лизати от отстранения оперативно тумор. Впоследствие дендритните клетки се съзряват и се инжектират подкожно по определена схема. Този тип имунотерапията се възприема добре от пациента поради липсата на токсичност и имунен отговор срещу ваксината и подобрява качеството на живот. Методът е най-ефикасен, когато се прилага след максимална хирургическа резекция, последвана от минимална химиотерапия и локализирана радиотерапия. (Parajuli and Sloan 2004; Van Gool et al. 2009)

## 2.2. Туморни стволови клетки

Както беше споменато, основната идея за развитието на ГБМ се явява промяната на нормални клетки от ЦНС в т.нар. туморни стволови клетки. Концепцията за малигнени клетки с характеристики на стволови клетки възниква на много ранен етап в патологията – още Вирхов отбелязва, че има сходства между някои ракови и

ембриогенетични процеси. (McLendon and Rich 2011) По-късно други учени намират доказателства за наличието на малко на брой клетки в туморите, способни да регенерират и формират колонии при клетъчно култивиране. (Huntly and Gilliland 2005) Туморните стволови клетки при глиобластома мултиформе отговарят за растежа, рецидивването и устойчивостта на радио- и химиотерапия от страна на тумора. Както вече споменахме, предполага се, че ТСК произлизат от НСК от субвентрикуларните зони, както и от техни прогенитори. Алтернативно ТСК могат да са резултат на дедиференционен процес, предизвикан при крайно диференцирани клетки. ТСК представляват малка група бавноделящи се клетки, способни на самообновление, туморогенност, диференциация в основните клетки на ЦНС и туморна регенерация. Според множество изследвания ТСК са на върха на йерархията при популациите от туморни клетки. (Yuan et al. 2004; Sanai et al. 2005; Liu et al. 2007; Stiles et al. 2008; Günther et al. 2008; Visvader and Lindeman 2008; Gürsel et al. 2011; Schiffer et al. 2012) Проучванията върху ТСК доказват, че те са крайно недиференцирани клетки и споделят сходни сигнални пътища с нормалните неврални стволови клетки – засилен пролиферативен потенциал, регулиран от EGF и basic fibroblast growth factor (bFGF), както и способност да се диференцират до неврони и глиални клетки при липса на тези фактори. Също както НСК, така и ТСК поддържат своето състояние в нишите при условия на относителна хипоксия (Jensen et al. 2006, Bar et al. 2010), докато наличието на фактори намиращи се в кръвния серум води до тяхната диференциация. (Dimov et al. 2011; Schiffer et al. 2012) Въпреки тези данни получени *in vitro*, се счита, че освен сигналите получавани от микросредата в нишата, ко-регулация на НСК се осъществява и от плазмени фактори, както и от разтворими молекули секретирани от ендотелните клетки. Сред тях особено място заемат факторите отговорни за ангиогенезата. Самите ТСК от своя страна са способни за секреция на VEGF, като така подпомагат ангиогенезата, а на свой ред новосъздадените кръвоносни съдове поддържат популацията от ТСК. (Bao et al. 2006; Folkins et al. 2009) Множество научни изследвания показват, че НСК и ТСК споделят експресия на общи маркери и сигнални пътища въввлечени в регулацията на клетъчната пролиферация и преживяване. (Singh et al. 2003; Singh et al. 2004; Galli et al. 2004; Sanai et al. 2005) Трансформацията на НСК или на по-диференцирани прогенитори в ТСК изглежда е свързана с „нормални клетъчни механизми, които се извършват в нарушен ред, време и интензивност”. (Sanai et al. 2005)

Основни данни за природата на ТСК са получени на базата на клетъчно култивиране на клетки изолирани от глиобластома мултиформе. Въпреки, че култивираните *in vitro* ГБМ-изолирани клетки едва ли са напълно идентични с тези в ЦНС, моделите на клетъчно култивиране дават възможно най-близка представа за реалното състояние на туморните процеси и са общоприет подход в туморната имунология. За първи път постоянни клетъчни линии от ГБМ са създадени през 60-те години на миналия век от Jan Poten и Bengt Westermark. (*Inda et al. 2010*) Те установяват че само 20% от туморните биопсии са в състояние да станат източник на постоянни клетъчни линии, докато от останалите 80% се получават само първични клетъчни култури. ГБМ клетките десетилетия наред са култивирани в традиционна среда, съдържаща 10% fetal bovine serum (FBS), като отглежданите клетъчни линии са туморогенни при имунокомпрометирани плъхове, но се различават коренно по отношение на генома и молекулярното разнообразие от първичния тумор. (*Kleihues et al. 2000*) Получените клетки, изолирани от ГБМ и култивирани по този начин дават клетъчна култура от фибробластоподобни клетки, залепващи по дъното на плаката – модел на култивиране известен като адхерентни клетки (АК). (*Ignatova et al. 2002, Galli et al. 2004, Yuan et al. 2004*)

По-късни данни, обаче, сочат, че за растежа на глиобластомните клетки са необходими по-специфични условия – клетъчната среда трябва да съдържа растежни фактори и да е безсерумна – условия, които се счита, че са по близко до специфичната ситуация в нишите. Доказва се, че телешкият серум, в който се култивират ГБМ клетките при описания АК модел съдържа фактори като Bone morphogenetic protein 4 (BMP4), които водят до невъзстановимата им диференциация. (*Ponten and Macintyre 1968; Westermark et al. 1973; Herrera and Inman 2009*) През 90-те години на миналия век се смята, че basic fibroblast growth factor (bFGF), познат още като FGF2 участва в неопластичната трансформация на глиомни клетки и в преминаването на нормални астроцити от състояние на покой към пролиферация и реактивност. През 1997 Joy et al. установяват, че в човешки глиални клетки вътреклетъчните нива на bFGF са различни при клетки в покой и при пролифериращи, като стигат до извода, че bFGF служи като ядрен регулатор на пролиферацията в астроцитни клетки. При клетките в покой bFGF се установява в цитоплазмата, докато при активирани клетки е описан в цитоплазмата и ядрото, независимо дали клетките са астроцити или неопластични клетки от глиални тумори. Същият научен екип съобщава, че намалените междуклетъчни контакти стимулират ядрената акумулация на bFGF. (*Joy A. et al. 1997*)

Още през 1962 Stanley Cohen идентифицира и изолира и друг фактор ключов в развитието на глиалните клетки - epidermal growth factor (EGF), а през 1976 е установено, че човешките глиомни клетъчни линии имат висока експресия на рецептора за EGF (EGFR), който може да бъде нормален или мутирал (съкратен вариант). (Cohen 1962; Libermann et al. 1984) Установено е, че повишената му експресия се дължи на EGFR гена амплификация (Libermann et al. 1985), като ко-експресията на EGF и рецептора му при ГБМ най-вероятно води до автокринно въздействие на този фактор. (Bachoo et al. 2002, Fomchenko et al. 2006, Hambardzumyan et al. 2008, Li et al. 2009)

ТСК, растящи в клетъчна култура в присъствието на растежните фактори bFGF и EGF са характеризирани въз основа на функционални критерии, като способността им да формират невросфери (НС модел). По късно в ГБМ са идентифицирани клетки със стволов/прогениторен фенотип, които формират невросфери и пролиферират под въздействие на EGF и bFGF. (Yung et al. 1982) Както показва името им, невросферите представляват сферични струпвания на пролифериращи клетки, формирани под въздействието на описаните фактори. Счита се, че НС се генерират от най-малигнените области на ГБМ, а също, че НС споделят същите генетични алтерации като първичните тумори и експресират маркери, характерни за НСК и ТСК като CD133, Musashi1, Nestin, Sox2 и REST. Смята се, че НС притежават капацитет за клоногенност и туморогенност. Въпреки ключовата роля на EGF и bFGF за развитието на НС, отговарящи на ТСК, се доказва, че ТСК получени от ГБМ пролиферират, формират НС и са способни на самообновление дори при липса на външна митогенна стимулация от описаните фактори. Също така ТСК са способни да формират интракраниални туморни образувания, подобни на ГБМ, в имунокомпрометирани мишки и без да са били под влияние на факторите. Авторите считат, че растежните фактори само повишават преживяемостта, пролиферацията и размера на НС. (Kelly et al. 2009)

Независимо от условията на култивиране (АК или НС модели), при клетките култивирани от ГБМ са описани специфични повърхностни и вътреклетъчни маркери най-типични, от които са Nestin, GFAP, CD44, Sox2, CD133, Musashi-1, CXCR4 и CD15. (Dimov et al. 2010)

Nestin е интермедиерен филамент, който се продуцира в НСК на бозайници по време на развитието на нервната система и спомага пролиферацията и миграцията им. Той участва в организацията на цитоскелета, клетъчната сигнализация, органелогенезиса и клетъчния метаболизъм. Експресията на този белтък корелира силно със свойството

стволовост на клетките и изчезва по време на тяхната диференциация, като се заменя от други филаменти, като неврофиламенти при невроните и glial fibrillary acidic protein (GFAP) при глиалните прекурсори. (*Cattaneo et al. 1990, Messam et al. 2000*) Смята се, че Nestin може да бъде ре-експресиран във възрастен организъм при някои патологични условия, като исхемия, възпаление, мозъчна увреда и неопластична трансформация. (*Cattaneo et al. 1990, Messam et al. 2000, Ehrmann et al. 2005*)

GFAP е интермедиерен филамент, който се експресира от множество клетъчни типове на централната нервна система, включително от астроцити (*Jacque et al. 1978*) и от епендимални клетки. (*Roessmann U. et al. 1980*) Счита се, че GFAP помага за поддържане на механичната структура на астроцитите, (*Cullen et al. 2007*) но точната му функция остава слабо проучена, въпреки многобройните изследвания. GFAP се експресира от астроцитни клетки в ЦНС (*Jacque et al. 1978, Venkatesh et al. 2013*) и участва в много важни процеси включително междуклетъчна комуникация и функционирането на кръвно-мозъчната бариера (КМБ). GFAP играе роля и при митоза, като коригира мрежата от филаменти в клетката. По време на митоза се наблюдава увеличено количество фосфорилиран GFAP и движение на този модифициран протеин към браздата на разцепване на клетките. (*Tardy et al. 1990*) Изследвания при мишки показват, че липсата на GFAP води до множество дегенеративни процеси, включващи неправилна миелинизация, нарушения в структурата на бялото мозъчно вещество и функционално и структурно увреждане на КМБ. (*Liedtke et 1996*) Този фактор, също така, е важен и при възстановяването на ЦНС след увреждане, като по-специално роля му се свързва с глиална пролиферация (глиоза) в множество места на ЦНС. (*Paetau et al. 1985; Tuccari et al. 1986*)

CD133 или prominin е повърхностен клетъчен маркер, експресиран от нормални човешки НСК. Първоначално е открит при невроепителни ембрионални стволови клетки от мишки. CD133+ клетки, изолирани от фетален черен дроб или кръв от пъпна връв, имат способността *in vitro* да се диференцират до нервни и глиални клетки, включително и до астроцити. Неговата експресия се преустановява по време на диференциацията на клетките и може да бъде ре-експресиран при някои малигнени процеси в мозъка. CD133 се намира по издатините на клетъчната мембрана, което предполага участието му в механизмите на клетъчен поляритет, миграция и взаимодействието на невралните стволови клетки със съседните им клетки и/или извънклетъчния матрикс. (*Uchida et al. 2000; Kania et al. 2005; Zhang et al. 2008; Beier et al. 2008*) Смята се, че при ГБМ CD133 е прогностичен маркер корелиращ с ниска

преживяемост. Ко-експресията му с Nestin или Ki67 се свързва с прогресия на заболяването и лоша прогноза за пациента. (*Uchida et al. 2000; Kania et al. 2005; Beier et al. 2008; Zeppernick et al. 2008; Pallin et al. 2008*) Смятало се е, че само CD133+ клетки са способни на самообновление и са отговорни за поддържането на тумора. Изследване на Wang et al. показва обаче, че CD133- ТСК също могат да формират тумори при трансплантацията им в мишки, а също, че от тези клетки могат да произлязат CD133+ клетки. (*Wang et al. 2008*) В литературата също така съществува мнението, че най-незрелите ТСК са Nestin+/CD133-, като се характеризират със засилена експресия на wtEGFR (нормален) или ΔEGFR (скъсен вариант). (*Schiffer et al. 2012*)

Някои изследвания посочват, че експресията на този маркер може да се регулира от хипоксията, както и от процес на митохондриална дисфункция. Този факт навежда на мисълта, че експресията на CD133 може да е в отговор на стресови сигнали получени от средата. (*Griguer et al. 2008*)

Sox-2 е от групата на т.нар. high mobility group (HMG) box транскрипционни фактори, експресирани от мултипотентните НСК. Нарушения в експресията на този белтък причиняват хипокампални дефекти (*Sisodiya et al. 2006*), като нормалната експресия на Sox2 в ранните етапи от развитието най-вероятно е необходима за задействане на програмите за диференциация на нервните клетки. (*Azuara et al. 2006, Lee et al. 2006*) В туморни клетки този белтък е с ядрена експресия, докато при хистологично нормалната съпътстваща тумора тъкан той е с предимно цитоплазмена експресия. Това предполага, че в ГБМ клетките има активация и транслокация на Sox-2 към ядрото. (*Ehtesham et al. 2009*)

CD44 е един от най-важните маркери за НСК, а също е познат и като маркер за ТСК. Той е представител на полиморфното семейство на клетъчно-адхезионните молекули, които играят ключова роля в механизмите на туморна инвазия и метастазиране. Смята се, че експресията на CD44 от туморните клетки е един от факторите определящи способността им да проникват в заобикалящата ги тъкан. Този маркер се експресира и при клетки изолирани от ГБМ. Изследване чрез конфокална микроскопия показва, че клетките от инвазивния фронт на туморите експресират CD44. (*Khoshyomn et al. 1997*) Свърх експресията на този маркер може да е от практическо значение за откриването на силно инвазивните типове глиоми, въпреки че не може да бъде използван самостоятелно като прогностичен маркер за преживяемост. (*Ranuncolo et al. 2002*) CD44 антагонистите ефикасно потискат растежа на глиоми при експериментални миши модели. Експресията на CD44 е повишена при по-злокачествени типове тумори на

ЦНС, като също така е по-висока в централната зона на тумора в сравнение с периферната област. От друга страна, ниски нива на CD44 експресията изненадващо корелира с ниска преживяемост на пациентите с ГБМ. (*Wei et al. 2010*)

Както става ясно към настоящия момент съществуват два основни модела за култивиране на ТСК от ГБМ: АК модел, при който клетките са култивирани без фактори, но с FBS и модел НС, където клетките са в безсерумна среда в присъствие на EGF и bFGF. (*Ignatova et al. 2002, Galli et al. 2004, Yuan et al. 2004, Dimov et al. 2010, Caldera et al. 2011*) Моделът на адхерентни клетки (АК) се характеризира с експресия на маркери, характерни за по-диференцирани клетки (GFAP, galacto-cerebroside (GalC) и bIII Tubulin), което дава основание да се счита за по-отдалечен от „истинските” ТСК. (*Schiffer et al. 2010, Caldera et al. 2011*) Безсерумната среда с EGF и bFGF, в която се отглеждат клетките при НС модела, по принцип, е предназначена за култивиранена НСК от мозък на бозайници, както и за ТСК изолирани от ГБМ. (*Shapiro et al. 1981*) Тези условия на култивиране възпрепятстват растежа на повечето не-стволови/не-неопластични клетъчни популации, като улесняват растежа на стволони и прогениторни клетки под форма на плаващи мултиклетъчни сфероиди. (*Furnari et al. 2007*) Смята се, че има разлики между двата вида клетъчни модели, които засягат свойствата им стволовост, клоногенност и туморогенност и отговарят един вид на йерархията на ТСК. (*Mazzoleni et al. 2010, Chen et al. 2010*) Може да се отбележи, че НС и АК растат в култура с различна скорост и че различните области от ГБМ имат различна способност да генерират НС. (*Hemmati et al. 2003; Caldera et al. 2011; Persano et al. 2011*) Schiffer et al. намират корелация между клетките способни да формират НС и да експресират Nestin, за сметка на GFAP и други стволони маркери и фенотипа на първичните тумори, а именно висока степен на малигненост, висока клетъчна плътност, гъстота на кръвоносните съдове, висок индекс на пролиферация, множество некрози и периваскуларни струпвания на туморни клетки. (*Schiffer et al. 2012*) Смята се, че ТСК запазват нативните си фенотип, генотип и кариотип под формата на НС, докато като АК акумулират аберации след няколко пасажа. (*Gürsel et al. 2011*) По отношение на експресията си на типични за НСК и ТСК клетъчни маркери се счита, че клетките в невросферите експресират Nestin, Sox-2, CD44 и CD133, а не експресират GFAP, за разлика от АК модела, чиито представители имат засилена експресия на GFAP, CD44, Nestin, но не и на CD133. (*Lee et al. 2006; Caldera et al. 2011; Schiffer et al. 2012*)

Въпреки че НС се приемат като по-добър модел за култивиране на ТСК, в сравнение с АК (*Lee et al. 2006*), има данни, които пораждават съмнение за стриктното разграничение между двата модела, що се отнася до ТСК (Таблица 2).

Стриктното противопоставяне на двата модела търпи критики и поради факта, че поставени в среда със серум НС се диференцират частично и преминават в АК, тоест серумът води до преминаване на сферичните образувания в прилепнали клетки.

Също така култивиране на ТСК, както като НС, така и като АК, често води до разстеж описан като „семи-адхерентен” или „полу-прилепнал”, при който се наблюдават едновременно НС и АК. (*Günther et al. 2008; Pavon et al. 2012; Kyurkchiev 2014*) Описано е също, че АК в присъствието на серум формират агрегати по дъното на плаките, които силно наподобяват НС и когато бъдат пренесени в безсерумна среда растат като НС. (*Caldera et al. 2011*)

Тази липса на стриктни разлики между двата класически модела води до разработката на т.нар. „междинни модели”. Когато ГБМ клетки са култивирани в среда типична за НС, която не съдържа серум, но съдържа EGF и bFGF в плака, покрита с ламинин (субстанция водеща до прилепване на клетките) те растат като АК. Основно предимство на този модел, според неговите автори е, че по този начин EGF и bFGF достигат до всички клетки, които в противен случай са недостъпни във вътрешността на сферата. Почти всички клетки при този модел демонстрират експресия на Nestin, Sox-2, CD133 и CD44. (*Gilbert and Ross 2009*)

Друг "междинен модел" използва плаки, покрити с polyHEMA агент, който предотвратява адхезията на ГБМ клетките, култивирани в условия за АК с FBS, но без фактори. Получават се "серумни сфери" и клетките показват по-силна експресия на Nestin, Sox-2 и CD44 в сравнение с традиционните модели на АК и НС. „Серумните сфери” не експресират CD133 и показват повишена способност за миграция и формиране на клетъчни колонии. (*Hong et al. 2012*)

Съществуват данни, че областите различаващи се от най-малигнения фенотип генерират по-малко, или изобщо не генерират, както НС, така и АК (*Persano et al. 2011*) Също така Mazzoleni et al. считат, че от един пациент могат да бъдат изолирани различни субпопулации ТСК, които са молекулярно и функционално различни, като EGFR експресиращите ТСК проявяват най-малигнения функционален и молекулярен фенотип. (*Mazzoleni et al. 2010*)

Таблица 2 Сравнение на експресия на маркери, характерни за НСК/ТСК, от клетки, изолирани от ГБМ при различни типове клетъчно култивиране. Легенда: + - установена е експресията на този фактор; ++ - установена е силна експресия на този фактор; +++ - установена е много силна експресия на този фактор; +/- - данните в научната литература са разнопосочни.

Условия за клетъчно култивиране	Вид растеж	Експресия на маркери				
		Nestin	Sox2	CD133	CD44	GFAP
EGF, bFGF, B27	НС	+	+	++	+	+/-
FBS	АК	+/-	+/-	+/-	+	+++
EGF, bFGF, B27 laminin	АК	+++	+++	+++	+++	+/-
FBS, poly-HEMA	“Серумни сфери”	++	++	-	++	няма данни

В заключение би могло да се обобщи, че съществуват два класически метода за култивиране на клетки, изолирани от ГБМ с цел получаване на ТСК. В безсерумна среда при наличие на EGF и bFGF клетките формират невросфери, докато в среда със серум без наличие на описаните фактори формират адхерентни клетки. Наред с класическите подходи съществуват и няколко алтернативни методи на култивиране. Въпреки, че в миналото моделът НС се е смятал за най-подходящ за култивиране на ТСК, множество по-нови данни оспорват тази концепция.

## 2.3. ГБМ и имунна система

### 2.3.1. Имунен отговор в ЦНС – особености

Централната нервна система е имунологично привилегирован орган, поради наличието на КМБ, но въпреки това много изследвания сочат, че взаимодействието между ИС и ЦНС са доста динамични (*Barker and Billingham 1977*) и се подчиняват на основното свойство на ИС да разпознава субстанции, източник на сигнал ”опасност”. Една от основните особености, с която се характеризира имунният отговор в ЦНС е, че ЦНС няма дренираща лимфна система или вторични лимфни тъкани и следователно липсва лимфоцитен трафик през през кръвно-мозъчната бариера. (*Aloisi et al., 2000*) Най-нови данни, обаче доказват, че дори това не е точно така. (*Louveau et al. 2015*) Кръвоносните съдове в мозъка са покрити с ендотелни клетки, образуващи помежду си здрави връзки

(tight junctions), които пречат на пасивния пренос на молекули и селектират клетъчния транспорт между мозъчната тъкан и кръвоносната система. (*Huber et al. 2001, Grant and Janigro 2004*) Въпреки описаните особености, данни от доста изследвания при различни заболявания сочат, че процесът на инициация на имунна реакция е подобен на този в останалите тъкани. Всяка специфична имунна реакция започва с разпознаване, процесирание и представяне на антиген от антиген представяща клетка. Установено е, че антигените разпознати в ЦНС биват транспортирани до шийните лимфни възли, където активират Т клетките, които впоследствие постъпват в мозъчната тъкан. (*Bradbury et al. 1981; Cserr and Knopf 1992; Aloisi et al. 2000; De Vos et al. 2002*) Там те се активират допълнително вследствие на антигенно-представяне от локални антиген-представящи клетки. Ключов компонент, както в имунния отговор в ЦНС, така и в индукцията на толеранс се явяват дендритните клетки. Те са професионални АПК, способни да представят различните антигени в комплекс с молекули от major histocompatibility complex (МНС) клас I и II, а също и притежават способност за процес известен като крос-презентация. Крос-презентацията е уникален процес, при който ДК представят екзогенни антигени, ендцитирани от околната среда (антиген-антияло комплекси или протеини от умиращи клетки) в комплекс с МНС клас I. По такъв начин те са способни да активират CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитите. Наред с това ДК секретират цитокини като IL-12 и IL-15, които подпомагат активацията на Т, NK и NKT клетките. (*Cole 2009; Aggarwal and Gehlot 2009; He et al. 2012*) В ЦНС, ДК са установени в менингите и plexus choroideus и чрез цереброспиналната течност са способни да мигрират към шийните лимфни възли, където да представят антигени. (*Mendez-Fernandez et al. 2005; Carson et al. 2006; Hatterer et al. 2006*)

В ЦНС около кръвоносните съдове се формира периваскуларното пространство, което съдържа популация от клетки подобни на макрофаги, наречени периваскуларни клетки. Смята се, че те също имат важна роля за антигенната презентация в шийните лимфни възли, както и роля за рестимулация на Т-клетките в мозъка. (*Graeber et al. 1992; Weller 1998*) Периваскуларните клетки експресират молекули от МНС клас II и ко-стимулаторни молекули, както в нормално състояние, така и при възпалителна стимулация. (*Graeber et al. 1992; De Simone et al. 1995*) Смята се, че те достигат регионалните лимфни възли и праймират Т-клетките, използвайки периваскуларните пространства. Един от доводите подкрепящи идеята, че периваскуларните клетки имат функция на АПК, е фактът че те произлизат от моноцит/макрофагиалния ред на кръвните клетки. (*Lassmann et al. 1993*)

T-лимфоцитите са основни участници в имунните реакции в ЦНС. Установено е, че наивните T-лимфоцити не преминават през КМБ, но активираните имат тази способност. (*Shrikant and Benveniste 1996*) Както беше споменато, характерна особеност на имунния отговор в ЦНС е и фактът, че T-клетките трябва да бъдат активирани отново от локални АПК, представящи същия антиген. Поради тяхното разположение в близост до КМБ и постоянната експресия на МНС клас II периваскуларните клетки са най-вероятните кандидати за рестимулация на периферно активираните T-лимфоцити. (*Hickey and Kimura 1988*) За астроцитите, хетерогенната популация клетки известни като микроглията/макрофаги и дори за невроните също се предполага наличие на способност за антигенно представяне. Въпреки голямата хетерогенност на клетки способни да изпълняват функциите на АПК в ЦНС, през последните години се набляга на идеята, че вероятно класическите ДК са основно ангажирани в тази роля. (*Greter et al. 2005*)

Наред с описаните особености, ЦНС също така се характеризира с ниска експресия на МНС молекули върху повечето паренхимни мозъчни клетки и относително висока концентрация на анти-инфламаторни цитокини. (*Foxwell et al. 1989; Miettinen et al. 1994*) Счита се, че тези особености осигуряват защита от твърде силен имунен отговор и съответно увреждане на мозъчната тъкан. (*Barker and Billingham 1977; Gehrman et al. 1995; Carson et al. 2006*)

На този етап от научното развитие все още трудно може да се твърди доколко описаните особености на имунният отговор в ЦНС касаят туморните заболявания там. Една от основните характеристики на ГБМ е неоангиогенезата. Новообразуваните кръвоносни съдове, обаче са значително изменени, със силно разширени или липсващи tight junctions, което на практика нарушава КМБ. (*Long 1970, Vajkoczy 2000*) Това откритие е довело до идеята, че нарушената КМБ може да доведе до повишен брой лимфоцити в мястото на малигнената формация и съответно до антитуморен имунен отговор. Допълнителни изследвания обаче сочат, че туморните клетки съпровождат капилярите, разполагайки се успоредно на ендотелните клетки, като изглежда разрушават молекули, важни за клетъчния homing на лимфоцитите и за провеждане на ефикасен имунен отговор. (*Chang et al. 2000; Ransohoff et al. 2003; Di Tomaso 2005*) От друга страна, редица научни данни сочат, че глиалните тумори секретират хемокини и хемокинови рецептори, което на фона на нарушената КМБ вероятно подпомага привличане на определени благоприятстващи туморното развитие лимфоцитни популации. Изясняването на тези механизми, както и на влиянието на привлечените от

ГБМ лимфоцити върху други клетки на ИС биха допълнили знанията за взаимоотношенията между компонентите на имунния отговор и глиобластома мултиформе.

### 2.3.2. Основни имуносупресивни механизми, използвани от ГБМ

При пациенти с ГБМ са добре документирани промени в ИС не само на локално, но и на системно ниво. Те се проявяват като нисък брой левкоцити в периферна кръв, най-често дължащ се на намален брой лимфоцити, промени в периферните кръвни мононуклеарни клетки, подтисната фагоцитоза и респираторен взрив, нарушение в антигенното разпознаване и нарушени IV тип реакция на свръхчувствителност. (*Koev et al. 2010; Dimov et al. 2010*) Смята се, че един от факторите отговорни за подтиснатия имунен отговор на пациенти с ГБМ са ТСК, но за пълното опознаване на механизмите, чрез които те влияят на имунните клетки са необходими още изследвания.

Дълго време изследванията в областта на туморната имунология са били основно насочени към изясняване на въпроса дали имунната система може да различи нормалните от малигнените клетки и дали реагира срещу тях. (*Old 1981*) През 1991г. Воон и колегите му за първи път клонират човешки туморен антиген и, доказвайки експресията му и реакцията срещу него, слагат край на споровете, подкрепяйки теорията за имунния контрол на Thomas и Burnet. (*Van der Bruggen et al. 1991*) Впоследствие се идентифицират нарастващ брой тумор специфични антигени, разпознавани от придобитата имунна система, а по-късно става ясно, че и структурите на вродената имунна система също разпознават различни молекулярни антигени върху раковите клетки. (*Van der Bruggen et al. 1991; Rosenberg 1999; Wu and Lanier 2003; Dunn et al. 2004*) От изследванията проведени през последните две десетилетия учените установяват, че туморите успяват да насочат действието на ИС в посока благоприятна за тях. Ето защо, въпреки че ИС има капацитета да разпознае малигнените клетки, тя не може да противодейства адекватно и да защити организма.

ГБМ е един от туморите, при които много ясно личи модулацията на ИС. (*Dix et al. 1990; Carpentier et al. 2006; Sampson et al. 2010*) Той е съставен от хетерогенни клетъчни популации, които не просто улавят сигналите от заобикалящата ги среда, но и им отговарят по начин благоприятстващ развитието на тумора. Прието е, че тумор-асоциираните клетки като васкуларни клетки, микроглия, периферни имунни клетки и неврални прекурсори взаимодействат директно с глиобластомните клетки и изпълняват

основна роля в развитието на заболяването. (*Goffart et al. 2013*) Както стана дума, ГБМ свързаната локална и системна имunosупресия е добре документирана и основна причина за нея е привличането на супресивни клетъчни популации (например: толерогенни дендритни клетки, Т регулаторни клетки, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), тумор-асоциирани макрофаги (TAM)). Наред с това развитието на ГБМ се свързва и с намаляване на броя и супресивната активност на цитотоксичните Т-лимфоцити, дефектната експресия на рецептори от моноцитите и експресия и продукция на различни имunosупресивни молекули, както от туморните клетки, така и от клетките на ИС. Такива са: transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), indoleamine-2,3-deoxygenase (IDO), IL-10, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), programmed cell death protein 1 (PD-1) и др. (*Roszman et al. 1991; Woiciechowsky et al. 1998; Zou et al. 1999; Fecci et al. 2006; Ogden et al. 2006; Rapp et al. 2006; Abe and Macian 2013*) ГБМ е „способен“ така да подбере клетъчните популации, инфилтриращи средата му, че да избегне ефективен имуноен отговор от ИС и дори нещо повече - привлечените имунони клетки придобиват такъв фенотип, че на практика подпомагат ГБМ растежа и инвазията. Всички тези процеси пречат за осъществяване на ефективен имуноен отговор и осигуряват безпрепятствено развитие на ГБМ.

### 2.3.3. Тумор асоциирани макрофаги (TAM)

ГБМ е тумор, при който се наблюдава значително присъствие на клетки с миелоиден произход в и около него. (*Kushchayev et al. 2012; Zhou and Bao 2014*)

Сред тези клетки микроглията и макрофагите изглежда са най-голямата популация, като представляват около 30% и липсва разлика в разпределението им в централната и периферна области на тумора. Тумор-асоциираните макрофаги биват два вида: микроглия произхождаща от локалните в ЦНС макрофаги и туморни макрофаги произхождащи от циркулиращите моноцити. Двете популации клетки е трудно да се отграничат, тъй като споделят много клетъчно повърхностни маркери като CD11b и Iba1. (*Akiyama et al. 1990; Deininger et al. 2000*) При експериментални модели на глиоми микроглията и макрофагите могат да бъдат диференцирани на база повърхностната им експресия на CD45 и CD11b, но при използване на тъканни проби тази сепарация не е толкова явна. (*Roggendorf et al. 1996; Badie and Schartner 2000*) Съществува възможност част от тумор-асоциираните макрофаги да произхождат и от астроцитите, които са придобили макрофагиален фенотип. (*Leenstra et al. 1995*) Ето защо голяма част от

авторите използват термина тумор-асоциирани микроглия/макрофаги (ТАМ), за да обозначат тези хетерогенни клетъчни популации, инфилтриращи ГБМ.

Чрез секреция на различни фактори, включващи хемокини, цитокини и матриксни протеини, ГБМ активно привлича и „създава” тумор-асоциирани макрофаги. (*Held-Feindt et al. 2010; Coniglio et al. 2012; Wang et al. 2012; Zhou and Bao 2014*) Едни от основните хемоаттрактанти открити при глиални тумори с участие при привличане на ТАМ са CCL2 или monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) и MCP-3. (*Desbaillets et al. 1994; Okada et al. 2009*) Stromal-derived factor-1 (SDF-1) е друг хемокин участващ в привличането на ТАМ при глиоми, като се предполага, че продукцията му е основна за процеса в областите с хипоксия и туморна инвазия. (*Kioi et al. 2010; Wang et al. 2012*) Bajetto et al. изследват експресия на хемокини и техните рецептори в тъкани от глиални тумори, като установяват експресия на рецептори CXCR1,2,3,4 и 5 при 60-90% от изследваната туморна тъкан, както и секреция и на съответни хемокини IL-8, growth-regulated oncogene (GRO) 1,2,3, IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10), monokine induced by gamma interferon (MIG), stromal cell-derived factor 1 (SDF1) и B cell-attracting chemokine 1 (BCA-1) съответно при 16-42% от туморите. Идентифицирането на ГБМ специфичните фактори, медиращи хемотаксиса по време на променения „антитуморен” имуноен отговор, както и на съответните им експресирани рецептори е важно за изясняване на молекулярните механизми, които са в основата на лимфоцитната инфилтрация в туморната тъкан. Важна особеност на микроглията и на макрофагите е, че веднъж привлечени в туморната микросреда под нейно въздействие те придобиват фенотип известен като M2. Той се характеризира със секрецията на IL-10, един от най-супресивните цитокини на имунната система, както и с намалена способност за фагоцитоза. Характерна за M2 клетките е и загубата на способността за МНС II експресия и съответно липсата на способност за антигенна презентация. Този вид клетки се характеризират също така с експресия на маркери, като inducible nitric oxide synthase (iNOS), CD163 и CD204. (*Yang et al. 2010; Zhou and Bao 2014*)

ТАМ са едни от важните участници в локалната имуносупресия и по този начин индиректно подпомагат растежа и инвазията на тумора. (*Black et al. 1992*) Предполага се, че е необходим директен контакт между ТАМ и глиобластомните клетки, за да се предизвика напълно имуносупресивен тип микроглия/макрофаги. (*Rodrigues et al. 2010*) От друга страна Wu et al. демонстрират, че ТСК участват активно в превръщане на периферни кръвни моноцити в имуносупресивни ТАМ благодарение на секрецията на различни фактори като colony stimulating factor (CSF), TGFβ1 и macrophage inhibitory

cytokine 1 (M1C-1). Получените от споменатите автори едноклетъчни суспензии от ГБМ, в които има малък брой ТСК, не могат да предизвикат промяна във фенотипа на моноцитите. За разлика от едноклетъчните суспензии, обаче среда от ТСК култури индуцира имуносупресивен фенотип при моноцитите, инхибира фагоцитозата им, индуцира секрецията им на имуносупресивни цитокини като IL-10 и TGF $\beta$ , засилва способността на моноцитите да инхибират Т-клетъчната пролиферация, да предизвикват анергия в ефекторните Т-клетки, както и да повишават броя на основните Т-регулаторни клетки, известни като Tregs. (Wu *et al.* 2004; Pollard *et al.* 2004; Hussain *et al.* 2006; Savage *et al.* 2008; Parney *et al.* 2009) Установено е също, че експресията на транскрипционния фактор signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) от глиобластомните клетки е важен фактор за реализирането на M2 фенотипа на TAM. Блокирането на Stat3 в туморните клетки води до възстановяване на способността на TAM за фагоцитоза, намаляване на секрецията им на IL-10, и като резултат до ограничаване на способността им за имуносупресия. (Zhou and Bao 2014)

Съществува силна корелация между количеството TAM и малигнеността на тумора. Счита се, че количеството инфилтриращи TAM зависи от типа ГБМ – значително по-голям брой се наблюдават при мезенхималния тип ГБМ, в сравнение с не мезенхималните тумори. (Komohara *et al.* 2008; Albesiano *et al.* 2010; Charles *et al.* 2011; Zhou and Bao 2014) Привлечените в тумора най-вече под действието на SDF-1 TAM секретират матриксна металопротеиназа 9 (MMP9), което води до повишаване на количеството VEGF, като може би по този начин TAM проявяват капацитет за инициране на ангиогенеза. (Kioi *et al.* 2010; Wang *et al.* 2012; Zhou and Bao 2014) Инфилтрация от TAM е описана при множество експериментални животински модели като: ГБМ при кучета, човешки ксенографски модели в имуно-дефицитни мишки и сингенни ГБМ в имунокомпетентни плъхове. Тези данни предполагат универсалната роля на TAM в развитието на ГБМ. (Zhou and Bao 2014)

#### 2.3.4. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)

Според някои автори особена форма на TAM са т.нар. myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), като е установено, че ГБМ привлича и този вид клетки. (Rodrigues *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010) MDSCs са хетерогенна популация от зрели и незрели миело-моноцитни клетки, които са открити при някои видове ракови заболявания и корелират с тяхната тежест. Те имат множество имуносупресивни действия включително засягане на антигенната презентация, индуциране на апоптоза в активирани Т-клетки и стимулация

на пролиферацията на Tregs. (*Almand et al. 2001, Gabrilovich et al. 2009, Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009*) При ГБМ е установена ролята на ТСК в индукцията на MDSCs, като нормални моноцити поставени под въздействие на ТСК придобиват MDSCs подобен фенотип, който се характеризира с експресия на CD11b и намалена експресия на CD14. MDSCs се характеризират с понижена експресия на B7-H1 молекулата, както и с повишена секреция на имunosупресивните IL-10 и TGF $\beta$ . Също така, при този вид клетки се наблюдава намалена фагоцитна активност, като едновременно е повишена способността им да предизвикват апоптоза в активирани Т-лимфоцити. Подобно на класическите TAM, директният контакт между нормални моноцити и ТСК е необходимо условие, за пълното придобиване на фенотипа им като MDSCs. Циркулиращи MDSCs подобни клетки се наблюдават в повишено количество и в периферна кръв на пациенти с ГБМ, което дава основание да се счита, че те участват и в системната имunosупресия, наблюдавана при тумора. (*Rodrigues et al. 2010*)

### 2.3.5. Дендритни клетки

Дендритните клетки са хетерогенна популация и въз основа на функциите си могат да бъдат разделени най-общо на толерогенни (незрели) и имуногенни (зрели).

При липса на възпаление или патогенна стимулация повечето ДК в периферните тъкани и лимфоидните органи имат отпочиващ (resting), незрял фенотип, който се характеризира с повишена ендцитоза и намалена повърхностна експресия на МНС и ко-стимулаторни молекули – CD40, CD80, CD86, както и със секреция на IL-10. Този тип дендритни клетки е известен като толерогенен. (*Wallet et al. 2005, Van Duivenvoorde et al. 2006*) При взаимодействие с патоген, проинфламаторни цитокини или CD40L, ДК придобиват активиран, зрял фенотип, при което се повишава нивото на МНС и ко-стимулаторни молекули, както и секрецията на различни провъзпалителни цитокини и хемокини (IL-1b, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12). (*Alaniz et al. 2004; van Gool et al. 2009*) След съзряване ДК се насочват към регионален лимфен възел, което води до инициране на Т и В-клетъчния отговор. Този процес се свързва с диференциация на CD4+ Т-лимфоцити към Th1 или Th2, активация на CD8+Т клетките и повишената им цитотоксичност, В-клетъчно съзряване и продукция на антитела, а също и активиране на NK и NKT клетки. (*MacPherson et al. 1999; Maldonado-Lopez et al. 2001; Dhodapkar et al. 2004*) Описаният фенотип дендритни клетки, стартиращи имуноген отговор се определя като имуноген тип.

Най-значимите цитокини поддържащи ДК в незрял, толероген фенотип са IL-10 и TGF $\beta$ . IL-10 се секретира основно от Т-клетки, моноцити, макрофаги и самите ДК (Moore et al. 2001), като формираните под действието му толерогенни дендритни клетки са способни да потиснат, както CD4+ така и CD8+ Т-клетъчна активация. TGF $\beta$  се секретира от Т-клетки, моноцити, макрофаги и гранулоцити. Той предизвиква потискане на съзряването и активацията на незрелите ДК, а също засяга придвижването им, инхибирайки експресията на хемокиновия рецептор CCR7 и потискайки способността им за миграция към лимфните възли. (Ellingsworth et al. 1986; Yamaguchi et al. 1997; Ogata et al. 1999; MartIn-Fontecha et al. 2003)

Толерогенните дендритни клетки, които са незрели и полузрели имат способността да предотвратяват имунна реакция, потискайки Т-клетъчната активация и/или насочвайки Т-клетъчния отговор в посока толеранс. Както става ясно ДК получават сигнали от заобикалящата ги среда, които ги насочват по кой път да поемат (имуногенност или толеранс). Туморите използват описаните характеристики на ДК, като чрез своите антигени, повърхностни рецептори и секреторни фактори, ги насочват в толерогенна посока. (Van Duivenvoorde et al. 2006) В резултат се получават ДК, които могат да инактивират CD8+ Т-клетки чрез механизъм включващ инхибиторните рецептори PD-1 и CTLA-4. (Van Duivenvoorde et al. 2006, Abe and Macian 2013) Свързването на PD-1, експресиран на повърхността на Т-клетките, със съответните му лиганди – PD-1L и PD-2L, върху повърхността на ДК води до блокиране на Т-клетъчната пролиферация, цитокинова продукция и цитотоксична активност. По този начин се супресира активацията, експанзията и функциите на ефекторните Т-клетки. (Riley 2009, Keir et al. 2006)

Свързването на комплекса В7-Н3, експресиран от ДК от още неустановения му Т-клетъчен лиганд също играе роля при потискане на активацията на ефекторните Т-лимфоцити. Друг комплекс, В7-Н4 при свързването си със също неизвестен лиганд върху Т-клетката, в условията на антигенна стимулация на Т-клетъчния рецептор, предизвиква арест в клетъчния цикъл и потиска пролиферацията и цитокиновата продукция на ефекторните Т-клетки. (Leitner et al. 2009; Sica et al. 2003) Дендритните клетки експресират на повърхността си и молекула, известна като herpesvirus-entry mediator (HVEM), която провежда негативни сигнали към Т-клетките чрез лигандите си В- and T-lymphocyte attenuator (BTLA) и CD160. Свързването с BTLA потиска антиген-зависимата Т-клетъчна активация, а свързването на HVEM с CD160 потиска активацията и цитокиновата продукция на CD8+ и активирани CD4+ Т-клетки. (Sedy et

*al. 2005, Cai et al. 2008*) Друг дендритно-клетъчен рецептор, свързването на който обуславя супресивно въздействие върху Т-клетките, е DEC-205, като връзката с него води до делеция на антиген специфични Т-клетки. (*Hawiger et al. 2001*)

Основният механизъм обаче, действащ наред с изброените, чрез който толерогенните ДК потискат Т-клетъчната активация, е липсата на т.нар. „втори сигнал”. Известно е, че връзката на комплекса В7 (CD80, CD86), експресиран на повърхността на дендритните клетки, със CD28, експресиран на повърхността на Т-лимфоцитите, е ключово условие за Т-клетъчна активация. Основна характеристика на толерогенните дендритни клетки е липсата на В7 експресия, като тази липса води до индукция на анергия във взаимодействащата Т-клетка. По този начин въпреки наличието на антигенно представяне от страна на ДК, то има като следствие анергия в ефекторните Т-клетки. (*Abe and Macian 2013*)

### 2.3.6. Tregs

Tregs (Т-регулаторни клетки) са малка хетерогенна популация CD4<sup>+</sup> Т-клетки, които имат регулаторни функции и предпазват ИС от прекомерна реакция и автоимунен отговор. В периферна кръв те съставляват 5-10% от CD4<sup>+</sup>Т-клетки, като най-изучавания подклас е CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs. Те индуцират имунен толеранс, инхибирайки съзряването на ДК и способността им да представят антигени, а също така и подтискат Т-клетъчната активация и пролиферация. Т-клетъчната супресия е контакт-зависима, но често се медира и/или от IL-10 и TGFβ. (*Sakaguchi et al.2004; Jiang et al. 2006; Kmiecik et al. 2013*) Наскоро е идентифицирана популация CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клетки, способни да супресират пролиферацията на алогенни и автоложни Т-клетки чрез контакт-зависим механизъм. (*Cosmi et al. 2003, Wei et al.2005*) Друга популация Tregs, която някои автори описават, включително в ГБМ обкръжението е CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Тази популация се индуцира от тумора и медира формирането на толерогенни АПК чрез повишаване на инхибиторните им рецептори, понижаване на експресията на ко-стимулаторните им молекули и наличие на силна повърхностна експресия на CD73, която може да доведе до Т-клетъчна супресия при взаимодействие на АПК с Т-лимфоцитите. (*Jeffes et al. 1993; Purdy and Campbell 2009; Hausler 2011*) Нови изследвания показват, че намалената експресия на рецептора за IL-7 – CD127 може да разграничи Tregs от останалите Т-клетки със същата ефективност, както и класическия им интрацелуларен маркер FoxP3 (*Simonetta et al. 2010*)

Tregs не са открити в нормална мозъчна тъкани и много рядко се откриват при нискостепенни глиални тумори и олигодендроглиоми. (*Heimberger et al. 2008; Jacobs et al. 2009*), но за сметка на това присъстват в ГБМ обкръжението. Имунохистохимични данни показват, че Tregs инфилтриращи мозъчни тумори са локализиращи основно в периваскуларните пространства и малка група е открита дълбоко в туморната маса. Тези клетки винаги се намират в близост до останалите лимфоцити, като се предполага, че това се дължи на контакт зависимото им действие. Акумулацията на Tregs силно корелира със степента на малигненост на туморите. (*Grauer et al. 2007, Jacobs et al. 2009*) Tregs при ГБМ експресират изключително високи нива на маркерите FoxP3 и CTLA-4 в сравнение със същата лимфоцитна популация в кръвта. Смята се, че до голяма степен инфилтрация на ГБМ от Tregs се дължи не на тяхната пролиферация в туморната микросреда, а на секрецията на цитокини основно от ТСК, които привличат тези клетки. (*Jacobs et al. 2009*) Счита се, че активацията на транскрипционния фактор Stat3 в ТСК води, както до потисната Т-клетъчна активация и засилена Т клетъчна апоптоза, така и до привличане на Tregs в туморното обкръжение. (*Dimov et al. 2010*) Съвременни изследвания *in vivo* показват, че намаляването на Tregs в туморното обкръжение медира регресия на тумора. (*Curiel et al. 2006; Motoyoshi et al. 2006; Sharabi and Ghera 2010; Kmiecik et al. 2013*) Освен, че Tregs инфилтрират малигнените глиоми, е установено, че техният брой в периферна кръв на пациенти с ГБМ е повишен на фона на общо намалени CD4<sup>+</sup> Т-клетки. Въпреки това данните за корелация между преживяемостта на пациентите и броя Tregs все още са разнопосочни. (*Fecci et al. 2006; El Andaloussi and Lesniak 2007; Heimberger et al. 2009*)

Доста съвременни изследвания са фокусирани върху взаимоотношенията между туморните стволови клетки, Tregs и останалите тумор инфилтриращи имунокомпетентни клетки.

Един от основните начини, по който ДК индуцират имуно толеранс в туморната микросреда, е чрез участието им във формирането на Tregs, като този процес се медира както от секреторни фактори, така и от прякото взаимодействие между клетките. Някои от секреторните дендритно-клетъчни фактори, участващи в индукцията на Tregs са IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-2 и IDO. (*Mellor and Munn 2004; Ghiringhelli et al. 2005; Awasthi et al. 2007; Mahnkete et al. 2007*) Наред със секреторните фактори, съществува и пряк контакт между някои молекули, експресирани на повърхността на дендритните клетки и Т-лимфоцитите, в резултат на взаимодействието на които, Т лимфоцитите се диференцират по посока Tregs. Пример за такъв е

взаимодействието между PD-1 рецептор върху наивните Т-лимфоцити, който се свързва с PD-1L и PD-2L на повърхността на ДК, като при наличие на TGFβ се стига до формиране на Tregs. (Francisco et al. 2009) Толерогенните ДК са способни да превърнат също и ефекторни Т-клетки в регулаторни такива, чрез експресията си на два рецептора – ILT3 и ILT4, които се свързват със съответните им Т-клетъчни лиганди и предизвикват тази трансформация. (Manavalan et al. 2003)

Взаимоотношенията между дендритните клетки и Tregs са сложни и многопластови. Двата вида клетки чрез преките си контакти, както и чрез цитокини, взаимно поддържат своя регулаторен фенотип. Като пример за това служи връзката CTLA-4 на повърхността на Т-клетките с B7 комплекса на повърхността на дендритните клетки. Тази връзка води до формиране на толерогенни ДК, които чрез автокринната си секреция на IFN-γ (Logue and Sha 2004), водят до последвала секретирания на IDO (Grohmann et al. 2002). IDO, от своя страна, участва в образуване на Т-регулаторни клетки. Успоредно с това IDO е ензим, който катализира аминокиселината триптофан до N-formyl-kynurenine и различни други метаболити, като по този начин Т-лимфоцитите стимулирани от IDO секретирани ДК, претърпяват бърза клетъчна смърт чрез апоптоза. Важно е да се отбележи, че изчерпването на триптофан в околната среда има силен ефект върху Т-лимфоцитите, който експериментално може да бъде обърнат чрез добавяне на екзогенен триптофан. (Munn et al. 1999; Grohmann et al. 2001; Munn D. et al. 2002)

## 2.4. Мезенхимните стволови клетки (МСК)

Макар и все още изключително малко на брой има проучвания, които изказват становище, че клетки с характеристика на мезенхимни стволови клетки могат да се свържат с имунната супресия осъществявана от туморното клетъчно обкръжение. От друга страна съществуват аналогии между МСК и *in vitro* модели, целящи изолирането на ТСК при глобастома мултиформе (Nakahata et al. 2011)

Мезенхимните стволови клетки (МСК) са фибробластоподобни, мултипотентни стволови клетки, които са способни на самообновление и диференциация в клетки, произлизащи от мезодермалния ред – до остеоцити, хондроцити, адипоцити, миоцити и тендоцити. Критериите за определяне на едни клетки като МСК са 1) способност за

адхезия към твърда повърхност, 2) потенциал за диференциация в остео-, адипо- и хондроцити, 3) експресия на характерни повърхностни молекули – над 95% от МСК експресират CD105, CD90, CD73 и са негативни за CD45, CD14 и CD34. МСК експресират МНС I, но не и МНС II, както и не експресират основните костимулаторни молекули необходими за имунния отговор – CD80, CD86 и CD40, като това определя техният неимуногенен фенотип. Характерни свойства за тези клетки са пластичност и трансдиференциация, определени като плурипотентност и способност за дедиференциация и редиференциация в нова посока, дори в клетки от немезодермален произход. (*Bassi et al. 2011*) Основните свойства на МСК в организма са да регулират хематопоезата, да секретират фактори, подпомагащи зарастването на рани, да контролират възпалението и тъканната регенерация и да стимулират ангиогенезата. Фундаменталният механизъм за поправка на увреждания се извършва от МСК, които мигрират от околните области и костния мозък в увреденият тъкан. Тези клетки действат чрез освобождаване на разтворими фактори и чрез клетъчен контакт. Те въздействат и върху клетките на имунната система като потискат възпалението и инхибират имунния отговор. МСК оказват имуносупресивен ефект, насочвайки имунокомпетентните клетки към развитие на имуноен толеранс. Този ефект се осъществява чрез пряко въздействие върху ефекторните клетки (В-,Т-, НК-клетки и фагоцити) или чрез индиректно въздействие чрез други клетъчни регулатори на имунния отговор. Взаимодействието на В-клетки с МСК води до намалена клетъчна пролиферация, миграция и продукция на имуноглобулини, докато действието върху Т-лимфоцитите се изразява в потискане на тяхната активация, пролиферация и диференциация до ефекторни клетки. По отношение на НК клетките, МСК могат да променят фенотипа, да потиснат цитотоксичността, пролиферацията и цитокиновата им секреция. (*Selmani et al. 2008; Ben-Ami et al. 2011*) При взаимодействие с неутрофили МСК потискат миграцията им и способността им да извършват респираторен взрив, като се смята, че отговорен за това е секретираният от МСК prostaglandin E2 (PGE2). (*Selmani et al. 2008, Djouad, F. et al. 2009*)

Индиректният ефект върху ИС МСК осъществяват чрез въздействие върху други имунорегулаторни клетки като ДК и Tregs. Под влияние на МСК се инхибира диференциацията на моноцитите до ДК, засяга се основната им функция за представяне на антигени, намалява се секрецията на хемокини и се повлиява цитокиновият профил на ДК към секреция на антиинфламаторни цитокини. По този начин се намалява способността на ДК да активират Т-клетките и имунният отговор се насочва към Th2

тип. (*Jiang et al. 2003; Ivanova-Todorova et al. 2009*) МСК под влияние на  $IFN\gamma$  насочват Т-лимфоцитите към диференциация в Tregs. За едни от основните фактори секретирани от МСК и насочващи Т-клетките към формиране на Tregs, се смятат CCL-2, HLA-G5 и IL-6. (*Djouad et al. 2007; Selmani et al. 2008; Ben-Ami et al. 2011*)

МСК въздействат върху клетките на ИС чрез пряк контакт или чрез секреция на цитокини. Този процес се извършва на два етапа: 1) МСК секретират хемокини, чрез които привличат клетките на ИС и 2) МСК секретират имуносупресивни фактори и/или осъществяват клетъчен контакт с имунните клетки. Основните фактори секретирани от МСК са TGF $\beta$ , IDO, PGE2, HLA-G5, IL-6, IL-10. (*Kyurkchiev et al. 2014*)

През 2012 година мезенхимни стволови клетки са демонстрирани в нормалната мозъчна тъкан от Paul et al. Изследователите установили, подгрупа от клетки наподобяващи перицити, които съпровождат мозъчната микроваскулатура в определени области на мозъка. За разлика от перицитите, обаче тези клетки експресират много от мезенхимните маркери, докато експресия на ендотелни, микроглиални, хемопоеични, и глиални маркери липсват. Освен това, тези клетки имат характеристики на стволови и показват способност да се диференцират до клетки от мезодермалния ред. (*Paul. et al. 2012*) Тези резултати показват, че МСК присъстват в периваскуларното пространство на нормалната мозъчна тъкан. Тъй като е известно, че МСК мигрират към места на тъканно увреждане, логично е да се предположи, че тези орган-специфични МСК могат да играят вероятно непряка роля във възстановяването на мозъчната тъкан. (*Wu et al. 2007; Paul et al. 2012*)

Приликите между тумори и хронични рани са добре установени, като се има предвид увреждането на околната стромална структура, която се наблюдава при малигнения растеж. (*Dvorak 1986*) Затова е логично да се предположи, че МСК биха могли да се придвижат до туморите, за да участват във възстановяването на тъканта. През 2001 г. Wallace et al. за първи път идентифицират МСК в първичните огнища на мултиплен миелом. Интересното е, че homing ефектът наблюдаван при МСК насочва научните проучвания към изследване на употребата им като вектор за антитуморни фактори като  $IFN\beta$ . (*Studený et al. 2004*) На базата на тези данни сега МСК се приемат като компонент от туморната строма.

През 2006 г. Tso et al., използвайки real-time количествен RT-PCR и имунохистохимия, установяват, че една субпопулация от първичните ГБМ тумори и получените от тях туморни клетъчни линии експресират клетъчни и молекулни маркери, които са свързани с МСК. Tissue microarray анализът потвърждава високата честота в

експресията на МСК-свързани маркери при първичен ГБМ в сравнение с вторичен или нормалната мозъчна тъкан. Първични ГБМ клетъчни линии, когато са третирани с адипогенна, остеогенна или хондрогенна индукционна среда, са способни да диференцират до съответните клетъчни типове от мезенхималния ред. Авторският екип предполага, предвид получените резултати, че най-малко една клетъчна субпопулация в ГБМ може би използва МСК-подобна програма, за да реализира малигнен фенотип. (Tso et al. 2006) Някои изследвания потвърждават наблюденията, че МСК имат широка роля при глиални тумори, като смятат, че в зависимост от условията на околната среда МСК могат да освобождават тумор-потискащи или тумор-поддържащи фактори. Произходът на тумор-асоциираните МСК може да бъде от привлечени локални МСК в туморната периваскуларна ниша или от такива привлечени от костния мозък. Установено е, че ТСК продуцират някои хемотаксисни фактори, които подпомагат привличането на МСК в първичните туморни огнища. (Dwyer et al. 2007)

## 2.5. ГБМ инфилтриращи ефекторни клетки

Наред с описаните клетки осъществяващи супресорни функция върху имунната система, факт е, че сред тумор-инфилтриращите клетки се наблюдават и такива с ефекторно антитуморно действие. Основен въпрос в туморната имунология, и в частност при антитуморния имунен отговор срещу ГБМ е доколко клетъчните ефекторни популации са ефективни срещу малигнените клетки. Както при всички тумори, така и при глиобластома мултиформе, основния антитуморен имунен отговор се осъществява от цитотоксичните Т-лимфоцити и от НК-клетките.

### 2.5.1. Т-клетки

Поради наличие на КМБ, както беше споменато по-горе ЦНС е орган, в който имунните реакции имат някои особености. Когато са активирани от специфични антигени в ЦНС, представени им в шийните лимфни възли, Т-клетките, могат да преминават кръвно-мозъчната бариера. Също така нарушената КМБ е основна характеристика при развитието на ГБМ, което позволява навлизане на Т-лимфоцитите в засегнатата област и, теоретично, осъществяване на ефективен имунен отговор. (Lohr et

al. 2011) На практика, обаче Т-клетките се оказват една от основните цели на тумор-асоциираната имunosупресивна микросреда. Един от основните механизми, който може да превърне антиген-специфичния отговор срещу туморите в неефективен е индуциране на анергия в Т-клетките. (Staveley-O'Carroll K. et al. 1998) Анергията в Т-лимфоцитите е описана като процес на селективно инактивиране (самоизключване), в резултат от активиране на Т-клетъчния рецептор (TCR) в отсъствието на подходяща ко-стимулация (основно чрез липса на CD28 стимулиране). (Jenkins M.K. et al. 1990) Описани са няколко форми на Т-клетъчна анергия, всяка срещаща се при определени условия и в отговор на различни стимули. Докладвано е, че анергията е типичен процес, който се среща в Т-клетки, инфилтриращи злокачествени тумори, (Staveley-O'Carroll K. et al. 1998) и се смята, че имunosупресивното естество на туморната микросреда е отговорно за това. По-специално, наличие на незрели дендритни клетки, характеризиращи се с липса на B7 комплекс, който да комуникира със CD28 води до неефективно (от гледна точка на индукция на имунен отговор) представяне на туморни антигени. (Sotomayor E.M. et al. 2001) По този начин субоптималното антигенно представяне, при липса на ко-стимулация, води до индуциране на Т-клетъчна анергия. Този процес засяга, както CD4+ така и CD8+ Т-клетъчните популации и е описан, както при солидни, така и при хематологични тумори. (Cuenca A. et al. 2003; Mescher MF et al. 2007) Анергия също така се предизвиква и поради липсата на ко-стимулаторни молекули, експресирани върху самите туморни клетки (Van Gool et al. 1996; Van Gool et al. 2000) Въпреки описаните механизми, обуславящи функционална супресия в Т-клетките, се наблюдава положителна корелация между CD3+CD8+ Т-клетъчна инфилтрация в ГБМ и повишена преживяемост на пациентите. (Kmiecik et al. 2013)

### 2.5.2. НК- клетки

Сред цитотоксичните клетки НК-клетките представляват най-ефективния компонент от защитата срещу туморни образувания и са подходящи кандидати за адоптивна имунотерапия. (Castriconi et al. 2009) Основен стимул за действието им е липсата или намалената експресия на МНС молекули при туморните клетки. (Gomez and Kruse, 2006) НК-клетките представляват приблизително 2 % от всички инфилтриращи ГБМ имунни клетки и се характеризират с предимно CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>negative</sup> фенотип. При други тумори за този фенотип е доказано, че отговаря на силно активирана НК

клетъчна популация. (Levy et al. 2011) Grzywacz et al., 2007 докладват, че при инкубация с туморни клетки НК-клетките намаляват експресията си на CD16, т.е. те се активират. В подкрепа на това са и данните, че в туморното обкръжение НК клетките експресират широк набор от активиращи рецептори, като лигандите за някои от тях се експресират от туморни клетки. Такива са например НК-клетъчния активиращ рецептор DNAX Accessory Molecule-1 (DNAM-1), разпознаващ poliovirus receptor (PVR) и Nectin-2, както и NKG2D (експресиран и от Т-клетки), взаимодействащ с MHC class I polypeptide-related sequence A/B (MICA/B) и UL16 binding proteins (ULBPs). (Castriconi et al. 2009)

НК-клетките експресират и инхибиращи рецептори, разпознаващи собствени MHC клас I молекули, както и скоро откритите leukocyte inhibitory receptors (LIR) и ILT, като вследствие на това взаимодействие се генерират инхибиторни сигнали, възпрепятстващи НК-клетъчната активация. Типът и броят на рецептор/лиганд взаимодействията са определящи за активацията на НК-клетките спрямо потенциалната цел. (Castriconi et al. 2009)

Резултатите получени от различните научни екипи относно експресията на MHC молекули от ГБМ и активацията на НК клетки са разнопосочни. Описано е, например, че при туморните клетки на ГБМ липсват класически MHC клас I молекули за сметка на експресията на MHC-E и MHC-G, които се свързват с инхибиторни рецептори на повърхността НК клетките. (Mittelbronn et al. 2007) Purdy и Campbell, 2009 изследват ГБМ клетки за наличие на повърхностни молекули, за които е известно, че активират или инхибират НК клетки. Те съобщават, че по-голямата част от туморните клетки са положителни за класическите HLA-A,B,C, които ги предпазват от НК-клетъчно медираната цитотоксичност. Същият екип изследва експресията на MICA и MICB — лиганди за активирания рецептор NKG2D експресиран върху НК и CD8 Т-клетки. Резултатите показват, че всички туморни клетки са негативни за MICB, но някои експресират MICA, което потенциално може да доведе до активиране на Т и НК клетки. (Kmiecik et al. 2013) Според данните, получени от Castriconi et al. всички култивирани ГБМ клетъчни култури експресират класически (HLA-A, -B, -C) и неklasически (HLA-E) клас I MHC молекули, но техните нива са прекалено ниски, за да осигурят защита на туморните клетки от НК лизис. Те също докладват, че клетките от всички изследвани ГБМ експресират PVR и Nectin-2, които са лиганди за DNAM-1 активирания рецептор на НК и че ГБМ клетки, показващи свойства, характерни за стволови клетки, са силно податливи на лизиране от алогенни и автоложни активирани

НК-клетки. Противоречивите данни относно активацията и/или инхибицията на НК клетките при взаимодействието им с клетките на ГБМ трудно може да се тълкува еднопосочно. Вероятно двата процеса на активация и съответно туморно лизиране, както и на инхибиция със съответното потискане на НК клетъчната цитотоксичност се осъществяват едновременно и успоредно, с различни количествени характеристики.

Множество от данните, покрелящи тезата за антитуморен клетъчен имунен отговор при ГБМ, показват, че част от туморните клетки експресират Fas, които представлява потенциална цел за Fas-медирана апоптоза, осъществявана, както от CD8+ цитотоксичните лимфоцити, така и от НК клетките. Туморните клетки от своя страна не експресират FasL, което предполага, че те не могат да индуцират Fas-медирана апоптоза в ефекторните популации. (*Gomez and Kruse 2006*)

## 2.6. Секреция на имunosупресивни фактори – цитокини

Цитокините са хетерогенна група мултифункционални белтъчни вещества, които участват в растежа, диференциацията, комуникацията и активацията на нормалните клетки. Цитокините осъществяват своя ефект чрез свързване с високо специфични мембранно-клетъчни рецептори, които провеждат сигнала чрез тирозин кинази или други вторични месинджъри, пренасящи сигнала до ядрото на клетката, задействайки транскрипционните системи там. (*Westermarck et al. 1985; Szelenyi 2001; Borish and Steinke 2003*) Правени са множество опити за разделяне на цитокините на про- и антиинфламаторни, като този вид разделяне, въпреки че е твърде относително и трудно може да се свърже с реалното многопластово цитокиново действие, е удобно за употреба и се използва широко в класификацията на цитокините. По отношение на секретиранияте цитокини Т-хелперните клетки биха могли да се разделят на Th1, Th2, Th3, Th9, Th17, Th22, Tregs. (*Raphael et al. 2015*) Всеки от изброените видове Т-хелпери чрез цитокиновата си секреция се свързва с регулацията на определен компонент от имунната система. Традиционно се счита, че за ефективен антитуморен имунен отговор е необходимо наличие на Th1 цитокини, контролиращи клетъчния цитотоксичен имунен отговор. Наред с това цитокиновата секреция е един вид средство за комуникация в туморната микросреда. (*Iwami et al. 2011*)

При пациенти с ГБМ, както вече казахме, се наблюдава супресия на клетъчно медиацията имунитет, както на локално, така и на системно ниво, като този процес е свързан с освобождаването на различни имуносупресивни фактори. Характерно за туморната микросреда при ГБМ е промяната на цитокиновата секреция от Th1 имуноен отговор към Th2 и повишената секреция на антиинфламаторни цитокини. (*Piperi et al. 2005*) Предполага се, че невъзможността на ИС да се справи с туморните клетки може отчасти да се дължи на тумор асоциираната цитокинова дисрегулация. (*Hao et al. 2002*) Съществуват множество доказателства за активна секреция от ГБМ на фактори, които инхибират и променят Т-клетъчните функции, както на локално, така и на системно ниво. Изследвания със супернатанти от ГБМ клетъчни култури показват потискане на Т-клетъчните функции на лимфоцити, получени от здрави донори. (*Taniguchi et al. 2000*)

Изследванията също така демонстрират, че за разлика от други мозъчни тумори, серум от пациенти с ГБМ супресира митогенната активност на автоложни нормални лимфоцити. (*Young et al. 1976; Levy 1978*) Хирургическото отстраняване на туморната маса води до частично възстановяване на Т-клетъчните функции *in vitro* и пълно възстановяване на експресията на МНС клас II молекули от кръвните моноцити. Обратно – възобновяването на туморния растеж е асоцииран отново с потискане на имунните клетки в периферната кръв. (*Brooks et al. 1981, Woiciechowsky et al. 1998*) Счита се, че степента на Т-клетъчна супресия корелира с туморната големина поради засилената цитокинова секреция от по-голямото количество малигенени клетки. (*Dix et al. 1999*)

Част от препологаемите фактори, които въздействат върху супресията на имунния отговор при ГБМ, са TGF $\beta$  1,2,3, PGE2, IL-6, IL-10, Gangliosides (GANGs). Твърде вероятно е тези фактори да действат в сложна комуникация помежду си, доказателство, за което е, че добавянето на пречистени цитокини като IL-10 или TGF $\beta$  не дава същия имуносупресивен ефект върху Т-клетките, както добавянето на супернатанта от ГБМ култури. (*Roszman et al. 1987; Elliott et al. 1992*) От казаното става ясно, че са необходими допълнителни изследвания относно разтворимите фактори, чрез които туморът действа върху различните клетъчни субпопулации в микросредата му.

## TGFβ

ГБМ клетките синтезират и секретират няколко форми на TGFβ – TGFβ1, 2 и 3. Този цитокин има способността да потиска експресията на повърхностни молекули от моноцитите, както и цитокиновата секреция и цитотоксичността на Т-клетките. (Bodmer et al. 1989; Golestaneh and Mishra 2005; Kaminska et al. 2005) TGFβ е фактор, описан при ГБМ през 1987 от Wrang и колеги именно като Т-клетъчен супресор. Този растежен фактор контролира много от клетъчните функции като пролиферация, диференциация, миграция, адхезия, ангиогенеза и преживяване при нормални клетки. (Wrann et al. 1987) Той осъщесвява функциите си, свързвайки се със специфичните си рецептори – T-bRs, които комуникират с цитоплазмени медиатори, наречени Smads. (Derynk et al. 2003). TGFβ не се секретира нормално в мозъчната тъкан, но при ГБМ е установена свръхекспресията му. Той може да супресира или активира туморния растеж в зависимост от стадия на туморното развитие, като секрецията му се асоциира с по-лоша прогноза в напреднал стадий на заболяването. (Rempel et al. 2000; Curtin et al. 2005; Hau et al. 2011) TGFβ, също така засилва продукцията на екстрацелуларен матрикс и засилва ангиогенезата, като едновременно потиска антитуморния ИО. (Curtin et al. 2005) TGFβ е част от Th3 клетъчния отговор, който се характеризира със силна имunosупресивна активност, специфично срещу тумор инфилтриращите Т-клетки (Hao et al. 2002) и се приема за основен секреторен фактор потискащ Т-лимфоцитите при ГБМ. (Strege et al. 2004) Изследвания върху Т-клетъчната пролиферация, използващи неутрализиращи TGFβ антитела, обаче показват, че самостоятелното му действие в тази насока е доста преувеличено. (Piperi et al. 2005)

## IL-10

IL-10 е 17-21kDa анти-инфламаторен цитокин, секретиран от активирани Т- и В-клетки, моноцити, дендритни клетки, макрофаги и някои ракови клетки. (Fiorentino et al. 1989; Mocellin et al. 2004; Mocellin et al. 2005) Наред с това, той е и Th2 цитокин, който има способността да инхибира синтеза на IFN-γ, IL-1α,β, IL-6, IL-8, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) и granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) от активирани моноцити и лимфоцити. (Cassatela et al. 1993) IL-10 също може да намалява капацитета за антигенна презентация на моноцитите и дендритните клетки, чрез подтискане на МНС клас II молекулите и В7 комплекса, което индиректно

възпрепятства антиген-стимулираната пролиферация на Т-клетките и продукцията на IL-2. (Hishii et al. 1995; Moore et al. 2001; Zhu et al. 2012) Глиомите синтезират и секретират IL-10, а експресията на IL-10 mRNA нараства сигнификантно на туморната степен на малигненост – 4% при степен II срещу 87,5% при степен III-IV. (Huettner et al. 1997) IL-10 се секретира от глиомни клетки *in vitro*, както и от ГБМ, като във втория случай води до инхибиране на IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  и до усилване на туморната прогресия. (Huettner et al. 1995) Секрецията на IL-10 може да бъде и индиректна, като е описано, че туморни фактори могат да я предизвикват от макрофаги и микроглия. След *in vitro* стимулация на моноцити, изолирани от пациенти с глиоми, със супернатанта от глиомни клетъчни култури, моноцитите започват да секретират IL-10, като това не се случва с моноцити, изолирани от здрави донори. (Zou et al. 1999; Iwami et al. 2011)

Има изследвания, които показват, обаче че не всички функции на IL-10 са свързани с имунна супресия. Съобщено е, че той може да усилва функциите на В, NK и CD8 $^{+}$  Т-клетки при животински модели на инфекциозни заболявания. (Iwami et al. 2011) Има автори, които твърдят, че IL-10 секретиралите CD4 $^{+}$  Т-клетки медиират туморното отхвърляне. (Segal et al. 2002) Във всички случаи са необходими още изследвания за функциите на този цитокин.

Наред с наличието на описаните антиинфламаторни и индуциращи толеранс цитокини, в туморното обкръжение са установени и класически проинфламаторни секреторни фактори като IL-1, IL-6 и IL-8, които активират Stat3/NF-kB сигналните пътища, както в туморните, така и в асоциираните клетки. Активацията на тези пътища, от своя страна води до продукция на други цитокини, които поддържат самообновлението на ТСК, както и на други туморни клетки. (Korkaya et al. 2011) Секретираните проинфламаторни цитокини и пътищата, които те регулират, приличат на тези активирани по време на хронично възпаление и може би представляват връзка между процеса на възпаление и раковите заболявания. (Korkaya et al. 2011) Оказва се, че Stat3/NF-kB сигналните пътища имат изключително важна роля в индуцирането и поддържането на проканцерогенна възпалителна микросреда и при иницирането на малигнена трансформация и туморна прогресия. (Dunn et al. 2002; Pardoll 2003; Zou 2005)

## IL-1

IL-1 семейството се състои от IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , както и от IL-1 рецепторния антагонист (IL-1Ra). Тези цитокини се секретират в резултат на инфекция или тъканна увреда и, свързвайки се с рецепторите си, активират NF- $\kappa$ B и в следствие обуславят секреция на IL-6 и IL-8. Локалната секреция на IL-1 от тумор-асоциираните макрофаги при злокачествени клетки предизвиква ангиогенеза, туморен растеж и метастазиране. Блокирането на IL-1 рецептора инхибира тези процеси при миши модели. (*Gery and Waksman 1976; Voronov et al. 2003; Sun et al. 2014*) Нормални мозъчни клетки също са способни да продуцират този цитокин, а IL-1 $\beta$  е един от често секретирани от ГБМ цитокини. (*Yamanaka et al. 1994*) Все повече изследвания сочат, че IL-1 $\beta$  участва в прогресията на ГБМ, взаимодействайки директно с туморните клетки по автокринен механизъм. Този цитокин активира разнообразни интрацелуларни пътища с различно участие в развитието на тумора. IL-1 $\beta$  повишава експресията на MMP-9 и засилва инвазивността на ГБМ клетъчни линии, а също така стимулира продукцията им на IL-6 и IL-8. (*Sarkar and Yong 2009; Yeunget al. 2012*) Действието на IL-1 $\beta$  също не следва да се тълкува еднозначно, тъй като първоначалните данни за него са за супресивно действие върху ГБМ. (*Sun et al. 2014*) Повишената му секреция се свързва с по-добър клиничен ход, а при ГБМ клетъчната линия GL15 системното третиране с IL-1 $\beta$  води до ДНК нарушения на ТСК и предизвиква апоптоза в тях. (*Castigli et al. 2000; Cuny et al. 2002; Sharma et al. 2011*) Sun et al. установяват, че IL-1 $\beta$  инхибира Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) и adrenomedullin (AM), които имат протективно действие срещу хипоксия-индуцираната апоптоза при глиобластомни клетки и по този начин съдейства за апоптозата на туморните клетки. (*Sun et al. 2014*) От казаното до тук може да предположим, че участието на този цитокин в прогресията на ГБМ е комплицирано и зависи от различни фактори като степента на хипоксия и експресията на други белтъци.

## IL-6

IL-6 е плейотропен цитокин, който играе ключова роля в имунорегулацията. Секретира се от неврони, микроглия, мезенхимни стволови клетки, астроцити, моноцити и макрофаги. (*Samaras et al. 2007; Hao et al. 2007; Samaras et al. 2009.*) При хомеостатични условия IL-6 участва в B-клетъчното съзряване и индукцията на остър възпалителен отговор. (*Van Wagoner and Benveniste 1999; Tanabe et al. 2010*) В ЦНС

има ключова роля в индукцията и модулацията на реактивната астроглиоза, патологичния възпалителен отговор и протекцията на нервната система при инфекции, травматично мозъчно увреждане и исхемия. Повишени нива на IL-6 се свързват с хронични възпалителни състояния, а при раково болни – с по-ниска преживяемост. Повишените нива на този цитокин корелират с хистологичната тежест на неоплазията. (*Van Meir et al. 1990; Scheller et al. 2006; Samaras et al. 2007; Wang et al. 2009; Bromberg et al. 2009*) При болни от рак на гърдата е установено, че IL-6 директно регулира самообновяването на ТСК, чрез задействане на Stat3 от IL-6R/GP130 комплекса. (*Sansone et al. 2007*) Stat3 активацията води до активация на NF-kB и секреция на допълнителни количества IL-6 и IL-8. Liu et al. 2011 установяват, че при болни от рак на гърдата се наблюдава привличане на костномозъчни мезенхимни стволови клетки (КМ-МСК) по градиента на IL-6 и че този цитокин е ключов компонент в поддържането на туморната маса чрез КМ-МСК и ТСК. Една важна функция на IL-6 е потискането на диференциацията на дендритните клетки, което определя толерогенния им фенотип. (*Jiang et al. 2006, Kyurkchiev et al. 2014*)

IL-6 заедно с рецептора си, е силно експресиран от ГБМ тумори и клетъчни линии. Установено е, че в ГБМ микросредата този цитокин се секретира главно от туморните клетки, макрофагите и в зоните на исхемична некроза. IL-6 е един от главните участници в развитието на ГБМ чрез спомагане на ангиогенезата, клетъчната пролиферация и устойчивостта на апоптоза и радиация. (*Goswami et al. 1998; Weissenberger et al. 2004; Saidi et al. 2009; Reynes et al. 2011*) Загубата на IL-6 сигнализацията може да предпази миши модели от развитие на мозъчен тумор, поради загуба на Stat3 активацията на ГБМ клетките. (*Wang et al. 2009*). В допълнение – периферните моноцити при пациенти с ГБМ секретират значително по-високи нива IL-6 в сравнение със здрави контроли. (*Samaras et al. 2007*)

## **IL-8**

IL-8 е провъзпалителен цитокин, който обуславя различни биологични процеси, като хемотаксис на неутрофили и ангиогенеза. Той активира множество интрацелуларни сигнални пътища чрез свързване със специфичните си рецептори CXCR1 и CXCR2. Секретира се от моноцити и макрофаги и подпомага миграцията на неутрофили, базофили и Т-клетки. (*Brat et al. 2005*) В туморната микросреда множество клетки, включително мезенхимални клетки, макрофаги и имунни клетки секретират IL-8.

(*Waugh et al. 2008*) Той е въввлечен в развитието на ГБМ чрез функциите си на хемоатрактант и промотор на ангиогенезата. Експресията му се иницира рано в развитието на тумора под действието на възпалителни стимули и нараства по-късно под влияние на намаленото кислородно съдържание в микросредата на ГБМ. (*Desbaillets et al. 1999*) Действието му се осъществява чрез инхибиране на апоптозата на ендотелни клетки и индукция на продукцията на матриксни металопротеинази (MMPs), които са необходими за ангиогенезата. (*Li et al. 2003*) IL-8 е фино регулиран цитокин, чиято секреция се стимулира от IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6 и IL-17 и може би е един от ключовите фактори, водещи до лимфоидните инфилтрати, наблюдавани при ГБМ. Установено е, че повишената концентрация на калции може да доведе до експресията му в ГБМ култури. (*Van Meir et al. 1990; Kasahara et al. 1991; Kehlen et al. 1999; Brat et al. 2005*) Открито е също, че ГБМ клетъчни линии постоянно експресират IL-8 mRNA и секретират IL-8. Повишеното количество на този цитокин в мозъка корелира с по-къса преживяемост при малигнени глиоми. (*Salmaggi et al. 2003*) Неутрализирането на IL-8 чрез добавяне на антитела към ГБМ клетъчна култура води до значително намаляване на инвазивността на клетките. (*Raychaudhuri and Vogelbaum 2011*)

#### IL-4

IL-4 се секретира от Т-клетките, мастните клетки и базофилите. (*Paul 1991*) Той играе основна роля при съзряването и пролиферацията на В-клетките, мастните клетки и Т-клетките. IL-4 предизвиква Th2 имунен отговор заедно с IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 и IL-13. (*Hao et al. 2002; Curtin et al. 2005*) IL-4 действа заедно с IL-13 в патогенезата на алергичните възпаления чрез директна активация на JAK и Stat3. (*Scheurer et al. 2008*) Има данни, че IL-4 инхибира продукцията на провъзпалителни цитокини и азотен оксид от микроглията. (*Wirjatijasa et al. 2002*) Инжектирането на IL-4 в плъши и миши мозъчни тумори, повишава преживяемостта в сравнение с контролни животни. Глиомни клетъчни линии и тъканни срези показват свръх експресия на рецептора за IL-4 в сравнение с нормална мозъчна тъкан. (*Kawakami et al. 2003; Curtin et al. 2005*)

## IL-12

IL-12 се секретира от зрели ДК и макрофаги и засилва функциите на цитотоксичните имунни клетки като цитотоксичните Т-лимфоцити (CTL) и NK-клетките. IL-12 също играе роля при В-клетъчната IgG продукция и активацията на неутрофили и ДК. (*Morse et al. 2004*) Повишеното ниво на този цитокин води до повишена секреция на IFN $\gamma$ , което от своя страна индуцира освобождаване на проинфламаторни цитокини. IL-12 е типичен цитокин, който поляризира Т-клетките към Th1 имунен отговор. (*Curtin et al. 2005, Carlsson et al. 2010*) При въвеждане на IL-12 в миши модели на мозъчни тумори се наблюдава повишена преживяемост, дължаща се на намаления растеж на тумора и повишената способност на Т-клетки за пролиферация и инфилтрация в туморната маса. Въпреки това антигенната презентация остава потисната и в следствие на това Т-клетките не са способни да лизират тумора (*Curtin et al. 2005*) Изследвания сред пациенти с ГБМ показват, че секрецията на IL-12 варира, както в серума така и в клетъчни култури, като тази секреция е по-скоро ограничена, като същото се отнася и за експресията на специфичните му рецептори – IL-12b1 и IL-12b2. (*Hao et al. 2002, Okada et al. 2011*)

## IL-17

IL-17 представлява група цитокини, състояща се от шест представителя (IL-17A, B, C, D, E, F). IL-17A споделя най-голяма хомология с IL-17F, като и двата подават сигнал чрез IL-17RA, който е тип I трансмембранен рецептор (*Parajuli and Mittal 2013*) IL-17 е основен ефекторен цитокин на Th17 клетките и след идентифицирането на Th17 имунния отговор се превръща в тема предизвикваща голям интерес в имунологията (*Harrington et al. 2005; Bettelli et al. 2007*) IL-17 е изследван като фактор в автоимунните заболявания, инфекциите, трансплантациите, алергични реакции и туморите. Установено е, че IL-17 засилва туморогенезата чрез някои механизми, като повишаване на фактори, свързани с ангиогенезата (VEGF и CD31), активирането IL-6-Stat3 сигналния път, инхибирането на IL-12R $\beta$ 2, като чрез последния механизъм се засяга Th1 функцията и се потискат цитотоксичните Т-лимфоцити (*Nam et al. 2008; Toh et al. 2009; Wang et al. 2009*) Описана е секреция на IL-17 от множество тумори, като *Chen et al. 2013* изследват туморни проби от 207 пациенти с карцином на гърдата и отбелязват, че тумори инфилтрирани с голям брой IL-17 секретирани клетки корелират

с висока хистологична степен на малигненост и с по-кратка преживяемост в сравнение с пациенти с тумори, съдържащи малък брой IL-17 секретирани клетки. *He et al. 2010* показват, че IL-17-медираните отговори промотират развитието на тумора чрез създаване на тумор-поддържаща микросреда в туморните огнища. Установено е също, че IL-17-медираната регулация на MDSCs е основен механизъм при тумор-поддържащите процеси. IL-17 супресира апоптозата на някои туморни клетъчни линии *in vitro* (*Nam et al. 2008*), което предполага, че този цитокин може директно да поддържа оцеляването на малигнените клетки. Съобщава се също за корелация между 2-годишна липса на туморна прогресия и нисък брой IL-17 продуциращите туморни клетки при пациенти с малигнени глиоми, което води до извода, че броя на IL-17 продуциращите клетки могат да бъдат използвани за прогностичен маркер при този вид тумори. (*Cui et al. 2013*)

### IL-18

IL-18 е цитокин, който принадлежи към IL-1 суперфамилия и се секретира основно от макрофаги, НК клетки и др. IL-18 действа чрез свързване към своя рецептор, и заедно с IL-12 индуцира клетъчно-медиран имунитет след третиране с микробни продукти. След стимулация с IL-18, НК-клетки и някои Т-клетки освобождават IFN- $\gamma$ , който играе важна роля в активирането на макрофагите. Астроцитите и микроглията при бозайници секретират IL-18 и експресират IL-18 рецептор (*Wheeler et al. 2000; Jeon et al. 2008; Chen et al. 2012*), които са неразделна част от нормалния диалог между глия и неврони и от отговора на мозъчната тъкан при нараняване. Нормалната мозъчна микроглия увеличава синтеза на IL-18 при условия на инфекция, хипоксично-исхемични състояния и травматични мозъчни наранявания. (*Felderhoff-Mueser et al. 2005; Alboni et al. 2010*) IL-18 е важно звено в развитието на нормална защита и патологично възпаление (*Dinarelo and Fantuzzi 2003; Monmtero et al. 2004*), наред с много други пътища, чрез насърчаване на IFN $\gamma$  синтез и насочване към Th1 имунен отговор. (*Kashiwamura et al. 2002*) Засилването на миграционния капацитет на клетките е сред най-известните ефекти на IL-18 като това му свойство е доказано при сърдечни фибробласти (*Valente et al. 2013; Siddesha et al. 2014*), макрофаги (*Rodriguez-Menocal et al. 2014*), неутрофили преминаващи през съдовите стени (*Lapointe and Buret 2012*) и коронарните артериални гладко мускулни клетки. (*Valente et al. 2013*)

Ролята на IL-18 се свързва с установяването му като важен растежен фактор, който има роля в миграционната способност на злокачествените клетки при рак на стомаха (*Kim et al. 2009*), плоскоклетъчен карцином (*Martone et al. 2004; Riedel et al. 2004*), рак на панкреаса (*Carbone et al. 2005*), епителен рак на яйчника (*Wang et al. 2002*), първичен и костно метастазиращ недребноклетъчен рак на белия дроб (*Okamoto et al. 2009*), рак на простатата (*Dwivedi et al. 2011*), дребно клетъчен рак на белия дроб (*Rovina et al. 2011*), хепатоцелуларен карцином (*Zhang et al. 2011*), метастатичен меланом (*Crende et al. 2013*), и други. През 2012 г., *Yeh et al.* описват решаващата роля на IL-18 и в миграцията на злокачествените клетки при глиобластом. Авторите установяват, че злокачествената резидентна микроглия в мозъка секретира повишено количество IL-18, когато е стимулирана от нарастващ глиобластом. Специфичните медиатори, чрез които се осъществява тази стимулация на микроглиалните клетки от туморните клетки, са екстрацелуларни матриксни протеини като фибронектин и витронектин. IL-18 се секретира и под действието на медиаторите на възпалението, екстрацелуларните матриксни протеини и клетъчните ефектори в туморната среда. Предизвиканата от IL-18 миграция на злокачествените клетки се свързва с патологията на ГБМ и неговата устойчивост на лечение. (*Yeh et al. 2012, Christofides et al. 2014*)

Установено е, че IL-18 се увеличава най-много при метастазиращи тумори. Тези констатации, съчетани с IL-18-стимулираната центробежна миграция при стомашни ракови клетки (*Kim et al. 2009, Kang et al. 2009*) и клетки на глиобластома (*Yeh et al. 2012*), посочват IL-18 като основна сигнална молекула за повишаване мобилността на клетките при ракови заболявания.

### **IL-23**

IL-23 е член на семейството на IL-12 и притежава силни про-възпалителни свойства. Този цитокин представлява хетеродимер, който се състои от субединицата на IL-12 – p40 и друг протеин – p19. Установено е, че IL-23 действа върху паметовите Т-клетки и дендритните клетки като директно предизвиква секреция на IL-12 и IFN- $\gamma$  *in vitro*. (*Yuan et al. 2006*) Няколко научни групи докладват мощна антитуморна активност на IL-23 включително и при мозъчни тумори. (*Lo et al., 2003; Hu et al., 2006*) *Yuan et al. 2006* описват, че стволови клетки, получени от костен мозък, които са генетично модифицирани да експресират IL-23 са способни да предизвикат анти-туморна специфична активност срещу вътречерепни глиоми при мишки. Съществува и

противоположно мнение, като някои изследователи установяват протуморогенен ефект на IL-23. (*Langowski et al., 2006*)

### IFN $\gamma$

IFN $\gamma$  е важен фактор за активирането на макрофаги, ДК и НК-клетки, като повишава цитотоксичността на последните. (*Morse et al. 2004*) Секрецията на този цитокин от Th1 клетки директно инхибира растежа на ГБМ клетките *in vitro*, засилвайки антигенното процесирание и презентация от клетките ангажирани с този процес, чрез повишаване на експресията на МНС I, II и други компоненти на антиген-представящия комплекс. (*Hao et al. 2002; Morse et al. 2004*) Установено е, че този цитокин играе ключова роля в индуцирането на експресията на death ligands върху повърхността на имунните клетки. ГБМ също е способен да експресира death ligands и логично може да се предположи, че те могат да бъдат задействани чрез IFN $\gamma$  и да се предизвика апоптоза в туморните клетки. При направените опити, обаче е установено, че податливостта на тумора към индукция на апоптоза значително варира. (*Iwami et al. 2011*) Съществуват литературни данни, доказващи, че количеството IFN $\gamma$ , секретирано от туморните клетки е повишено при ГБМ (*Okada et al. 2011*), като този цитокин предизвиква IL-6 експресия, която е свързана с устойчивост на лечението при глиоми. (*Iwami et al. 2011*)

### TNF $\alpha$

TNF $\alpha$  се секретира основно от моноцити, макрофаги, НК-клетки и Т-клетки, а Т-клетките и ендотелните клетки експресират и TNF $\alpha$  рецептори. В нормална мозъчна тъкан този цитокин е отговорен за съзряването на ДК. TNF $\alpha$  е член на Th1 цитокините и заедно с IFN $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-15 и lymphotoxin може да предизвика клетъчно - медиран имунен отговор, включително и срещу тумори. (*Hao et al. 2002; Morse et al. 2004*) TNF $\alpha$  има антитуморен ефект, който включва способността му да стимулира Т-клетки, гранулоцити и НК-клетки. Той индуцира, както автокринната си генна транскрипция, така и генната транскрипция на IL-1, IL-6 и IL-8. (*Tanabe et al. 2010, Brat et al. 2005*) От друга страна експресията му от мозъчни тумори корелира със степента на малигненост, като клетки на 80% от глиобластомите го експресират. (*Maruno et al. 1997; Morse et al. 2004*) Рецепторът за TNF $\alpha$  има силна експресия при ГБМ, както в тъканни срези, така и при клетъчни култури. (*Hao et al. 2002*) Секрецията

на този цитокин от тумора води до поддържане на развитието на глиомите чрез стимулиране на ангиогенезата. (*Yoshida et al. 1997*) Съществува предположение, че различните ефекти на действието на TNF $\alpha$  може би се дължат на различното количество – ниските нива на секреция водят до засилване на ангиогенезата, докато високите – до блокирането ѝ. (*Fajardo et al. 1992*)

### *Клетъчноадхезионни молекули*

Част от биологичните характеристики на глиомите включват клетъчната миграция на туморните клетки, прекъсване на взаимодействията между ендотелните клетки, както и адхезия на туморните клетки към междуклетъчния матрикс, и образуването на нови междуклетъчни взаимодействия. (*Kargiots et al. 2006*) Все повече нарастват доказателства за важността на адхезионните молекули в сложния процес на туморно развитие, инвазия, метастазиране и взаимодействие с имунните клетки (*Burim et al. 2009*) Клетъчно-адхезионните молекули, включващи ICAM-1 и PECAM-1, участват в описаните процеси и допринасят за инфилтрационна способността на глиомите. (*Vitolo et al. 1996*)

Тромбоцит ендотелна клетъчна адхезионна молекула 1 или CD31 (PECAM-1/CD31) е член на имуноглобулиновата суперфамилия и е открита върху повърхността на тромбоцити, моноцити, неутрофили и някои типове Т-клетки. Открита е и разтворима форма на PECAM – sPECAM, но функциите и са слабо проучени. PECAM-1 съставлява важна част от междуклетъчните връзки между ендотелните клетки и участва в левкоцитната трансмиграция, ангиогенезата и активацията на интегрини. (*Jackson 2003*) Съобщава се за експресията на PECAM-1 в туморни клетки (*Listi et al. 2004*), която вероятно благоприятства процеса на ангиогенеза чрез подпомагане на специфични взаимодействия между глиалните и ендотелни клетки (*Burim et al. 2009*) Оказва се, че тази молекула играе основна роля в ангиогенезата и инвазията и при малигнени глиоми. Микроваскуларна пролиферация е хистопатологичен белег на анапластичните олигодендроглиоми, както и на ГБМ. Имунохистохимично изследване на тези два вида тумори показва, че PECAM-1 се експресира от всички ендотелни клетки в изследваните тъкани и от някои туморни клетки. Експресията на PECAM-1 от туморните клетки може би подпомага ангиогенезата чрез специфични взаимодействия с глията и ендотелните клетки. (*Aroca et al. 1999*) Друго изследване при плъши модели показва, че тази молекула се експресира в значително по-големи количества от инфилтриращите

туморни участъци в сравнение със сърцевината на туморите и нормалната мозъчна тъкан. Екипът предполага, че инфилтриращите туморни клетки може да предизвикват микроваскуларната пролиферация, свързана с участието на PECAM-1. (*Braganhol et al. 2009*)

Интерцелуларната адхезионна молекула-1 (ICAM-1) или CD54, е едноверижен 76-110 kDa гликопротеин и е член на суперсемејството на имуноглобулините. (*Diamond et al. 1991*) ICAM-1 е повърхностен гликопротеин, който се експресира основно от ендотелните клетки и клетките на ИС и се свързва с интегрини от тип CD11a/CD18 или CD11b/CD18. Няколко изследвания са показали, че ICAM-1 се експресира в човешки глиомни клетки и тази експресия се повлиява от цитокини. (*Burim et al. 2009*) Докладвана е експресията на ICAM-1 във високостепенните глиоми, докато при нискостепенни глиоми тя е слаба и липсва при нормална мозъчна тъкан (*Kuppner et al. 1990*) В допълнение към това, друго проучване показва, че интратуморни ендотелни клетки експресират ICAM-1, което предполага неговото значение за привличането на циркулиращите лимфоцити. (*Rice and Bevilacqua 1989*) Освен мембранно асоциирана форма ICAM съществува и в разтворима форма sICAM. sICAM-1 може да се свързва с lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) и се смята, че има значение за осъществяване на процеса на имуномодулация.

Взаимодействията между туморните и ендотелните клетки играят ключова роля в процеса на туморен растеж, инвазия и метастазирание. Изследване върху глиомни клетъчни линии C6 показва, че третирането на ендотелни клетки с TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IFN $\gamma$  значително повишава адхезията на глиомните клетки към ендотелния монослой. Адхезията на глиомни клетки към TNF-активирани ендотелни клетки се блокира от моноклонално антитяло срещу ICAM-1 или  $\beta$ 2 интегрин. На базата на тези данни се предполага, че ICAM-1 и  $\beta$ 2 интегрин функционират като индуцируеми клетъчни повърхностни молекули, които могат да подпомагат адхезията на глиомни клетки към ендотелните клетки. (*Tamaki et al. 1995*)

### **Матриксни металопротеинази**

Матриксните металопротеинази (MMPs) медираат разграждането на белтъчните компоненти на екстрацелуларния матрикс и на базалните мембрани, които са от съществено значение за взаимодействието между клетките. (*Sternlicht and Werb 2001*) Те представляват структурно-подобни, цинк-зависими ендопептидази. MMPs

разрушават екстрацелуларния матрикс и играят централна роля в редица физиологични процеси, включително ембрионалното развитие и растеж, имплантиране, морфогенеза, костно ремоделиране, зарастване на рани, ангиогенеза, апоптоза и невронален растеж. (Nagase and Woessner 1999) За осъществяване на споменатите процеси MMPs са продуцирани от трофобласти, кератиноцити, преостеокласти, остеокласти и фибробласти. (Vu and Werb 2000) Повишена експресия и активация на MMP също така се наблюдава и при някои патологични процеси като ревматоиден артрит, кардиоваскуларни заболявания и малигнени заболявания.

Повишени нива на MMPs са открити в глиобластомни клетъчни линии, както и в ГБМ биопсии за разлика от нискостепенен астроцитом и нормална мозъчна тъкан. (Hagemann et al. 2012)

MMP7 или матрилизин е открит от Sellers и Woessner в матката на плъх през 1988 г. (Woessner and Taplin 1988) Основната роля на разцепената/активна MMP7 е да разруши извънклетъчния матрикс чрез разграждане на макромолекули като казеин, желатин тип I, II, IV, V, фибронектин и протеогликан. (Woessner and Taplin 1988; Yokoyama et al. 2008) MMP7 изглежда участва във възпалителните процеси, както и в туморното метастазиране. Свърхекспресиранията и секретиранията в голямо количество MMP7 е свързана с много злокачествени тумори, включително на хранопровода, стомаха, дебелото черво, черния дроб, панкреаса и бъбреците. Високата експресия на MMP7 улеснява туморната инвазия и ангиогенеза чрез разграждане на извънклетъчни матриксни макромолекули и съединителна тъкан. Активиранията MMP7 може да активира и MMP2 и MMP9, с което допълнително да улесни туморната инвазия. (Yokoyama et al. 2008; Edman et al. 2011)

MMP протеолитична активност основно се осъществява от стромални клетки, но е установено, че матрилизин (MMP-7) се произвежда и от туморните клетки на глиомите. Изследване на MMP-7 при човешки глиоми показва наличие на MMP-7 иРНК, както и самия протеин. При сравнение на количеството експресирана MMP-7 в туморна клетъчна линия U87 и плъши модел на U87 имплантирани в мозъка показва, че експресията на MMP-7 в клетъчна култура е слаба, докато нивата ѝ са високи при имплантацията на туморните клетки в мозъка на експерименталното животно. Авторите доказват, че металопротеиназата е секретиранията от туморните клетки. (Rome et al. 2007)

Hagemann et al. също потвърждава тезата, че MMP-7 е тясно свързана с малигнената прогресия при ГБМ, като изследванията му показват слаба MMP-7 имунореактивност в

туморната маса, локализирана около цитоплазмата на туморните клетки, макрофагите и ендотелните клетки на малките капиляри. (*Hagemann et al. 2012*)

Друга металопроотеиназа, за която е установена роля в поддържането на туморни стволови клетки при рак на бял дроб при мишки е MMP-10 (стромелизин 2). MMP-10 е силно експресирана в култури формиращи онкосфери и RNAi-медирано отстраняване на MMP-10 води до загуба на генната експресия за маркери на ТСК и до инхибиране на растежа на онкосферите. Също така се ограничава тяхната способност за клонална експанзия и за растежа *in vitro*. Клоналната експанзия на дефицитните за MMP-10 онкосфери може да се възстанови чрез добавяне на екзогенен протеин MMP-10 към културалната среда, което показва пряка роля на MMP-10 в пролиферацията на тези клетки. Онкосферите проявяват засилена туморо-образуваща и метастатична активност, когато се инжектират в сингенни мишки, докато MMP-10-дефицитните култури показват значителна неспособност за иницирането на тумор. Анализ на данни за генна експресия получени от различни видове рак при човека разкрива силна положителна корелация между туморната експресия на MMP-10 и метастатичното поведение на различните видове тумори. (*Justilien et al. 2012*) Все още в литературата не могат да се намерят данни за ролята на MMP-10 при глиобластома мултиформе.

#### *Progesterone induced blocking factor (PIBF)*

Една от хипотезите за туморното развитие гласи, че злокачествените тумори използват механизми подобни на механизмите на фетуса за изплъзване от контрола на имунната система. (*Check et al. 2001*) Те секретират имуносупресивни молекули и други фактори, вследствие, на което туморите проявяват неконтролируем растеж, ангиогенеза и способност за инвазия в околните тъкани. Някои представители на тези фактори са прогестерон (Pg) и индуцираният от него Progesterone induced blocking factor (PIBF). Установено е, че дори сравнително ниски стойности на Pg (100-400 nmol/kg) са достатъчни, за да инхибират активацията на периферните НК-клетки в здрави бременни жени. Ефектът на Pg се осъществява благодарение на прогестеронови рецептори (PRs), експресираните от таргетните на действието му клетки. Експресията на PRs върху лимфоцитите е хормон независима и се предизвиква от тяхната активация. Действието на Pg включва структурна промяна на PRs, което му позволява да се свърже с ДНК и да предизвика синтез на белтъци. (*Szekerez-Bartho and Polgar 2010*) Установено е, че в нормалната мозъчна тъкан също се секретира Pg, като

концентрацията в отделните мозъчни региони варира между 25 и 80nmol/kg. (Weill-Engerer et al. 2002) Глиалните тумори експресират рецептори за Pg като техният брой се повишава с повишаването на степента на малигненост на тумора. (Altinoz et al. 2001) Progesterone-induced blocking factor (PIBF) е открит при изследвания в сферата на репродуктивната имунология. Той е 34kDa белтък, секретирани под прогестеронова индукция от  $\gamma/\delta$  Т-лимфоцити по време на бременност. (Szekeres-Bartho et al. 1985) Пълноверижният PIBF (90kDa) е асоцииран с центрозоите като компонент от перичентриоларните сателити, които са въввлечени в регулацията на клетъчния цикъл и е доминиращата клетъчна форма на PIBF. Предполага се, че PIBF не е интегрален компонент на центрозоите, а е асоцииран към микротубулите им. По-къси варианти – първоначално открития 34 kDa и наскоро установения 35kDa, които са резултат от алтернативен сплайсинг, се откриват в цитоплазмата и се секретират от клетките. (Polgar et al. 2004; Lachmann et al. 2004; Szekeres-Bartho and Polgar 2010; Halasz et al. 2013) Свърхекспресията и мутацията на центрозомално асоциираните протеини, наблюдавани при тумори, корелират с центрозомалната амплификация и анеуплоидия. (Fisk et al. 2002) През 2004 Lachmann et al. установяват, че постоянната свърхекспресия на пълноверижния PIBF води до наличие на клетки с неправилна ядрена морфология и в следствие до клетъчна смърт. Същият екип установява сложен модел на алтернативен сплайсинг, създаващ различни PIBF транскрипти, а също така наблюдава различен модел на сплайсинг, осъществяващ се в туморните клетки, който дава като резултат 35kDa белтък. Предвид получените резултати те изказват предположението, че дисрегулацията на алтернативния сплайсинг на PIBF гена може да е фактор въввлечен в туморното формиране. (Lachmann et al. 2004)

PIBF експресия е установена в бързо пролифериращи клетки и тъкани, като човешки трофобласт (Check et al., 2009), мезенхимни стволови клетки от различен произход, включително децидуални (Kyurkchiev et al. 2011; Kyurkchiev et al. 2013), както и в редица туморни клетъчни линии (Check et al. 2001; Mikoja et al., 2011) и солидни злокачествени тумори. (Check et al. 2001; Lachmann et al. 2004) Анализът на mRNA PIBF на множество човешки туморни клетъчни линии от различен тъканен произход, както и от тъкани на PgR+/PgR- тумори на гърдата установява свърхекспресия mRNA за PIBF при всички интензивно пролифериращи клетки. (Szekeres-Bartho and Polgar 2010) Доказано е, че тази експресия може да се индуцира и по механизми независими от присъствието на прогестерон. (Lachmann et al. 2004; Szekeres-Bartho and Polgar 2010) При част от споменатите туморни клетъчни линии е доказана експресия и на самия

протеин. (Check et al. 2007; Srivastava et al. 2007) В следствие е установен и генът за PIBF, намиращ се в хромозома 13 (13q21-q22), в близост до гените отговорни за предразположеност към рак на гърдата и туморната прогресия. (Rozenblum et al. 2002) Доказано е, че в този регион от хромозома 13 се наблюдават редица соматични делеции в клетките на различни злокачествени тумори (Caballero et al. 2001), което донякъде дава яснота за участието на PIBF при редица процеси, свързани с малигнизация. Допълнителна яснота дава и фактът, който вече беше споменат, че 90kDa пълна форма на PIBF е с центрозомна вътреядрена локализация. (Kim and Rhee 2011) PIBF е част от периплантиоларните сателити (Halasz et al. 2013), които вземат участие в регулацията на клетъчния цикъл. Има данни, че нарушенията именно в дубликацията на центрозоми водещи до неравномерна сегрегация на хромозомите се асоциира с развитие на малигнени процеси. (Fisk et al. 2002) От друга страна секретираният по-малки изоформи на белтъка, които са резултат от алтернативен сплайсинг, действат като стимулират Th2 цитокиновата синтеза и потискат NK-клетъчната цитотоксичност, като така подпомагат потискането на локалния противотуморен имуноен отговор. (Lachmann et al. 2004)

PIBF осъществява имуносупресивен ефект, чрез потискане на NK-клетъчната цитотоксичност, като редица изследвания показват, че чрез инхибиране на арахидоновата киселина PIBF, влияе върху простагландиновата синтеза и така осъществява контрол и потискане на активността на периферните NK-клетки (Szekeres-Bartho et al. 1983; Par et al. 2000), PIBF също така инхибира перфориновата екзоцитоза и понижава лимфоцитната цитотоксичност. (Laskarin et al. 2002) Друго негово имуносупресивно свойство, както стана дума е способността за поляризиране на имунния отговор към Th2, който се оказва по-благоприятен за развитието и пролиферацията на малигнените тумори. (Lachmann et al. 2004) В същото време неутрализирането на имуномодулаторния ефект на PIBF, води до увеличаване на Th1 провъзпалителния цитокин IL-12 от лимфоцити. (Par et al. 2000) Предизвиканата от PIBF повишена секреция на Th2 цитокини като IL-4, IL-6 и IL-10 (Szekeres-Bartho and Wegmann 1996) се осъществява през IL-4R $\alpha$ /PIBFR рецепторен комплекс по пътя на Jak1/STAT6 киназната активация. (Hou et al. 1994; Horejsi et al. 1998) Това превключване към Th2 цитокинов профил, под PIBF индукция води и до продукция на непреципитиращи, асиметрично гликозилирани антитела (IgG) (Margni et al. 1988), които по своята функция подпомагат туморния растеж, тъй като са неспособни да

осъществяват ефекторните си функции като фиксация на комплемента, опсонизация и анти тяло медирана клетъчно-зависима цитотоксичност. (*Check et al. 2009*)

Halasz et al. 2013 показват в изследване, че при тумори PIBF улеснява инвазията им, активирайки гените на MMP-2 и MMP-9.

PIBF може директно да регулира генната експресия на IL-6, EGF и Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), като е способен, както да активира, така и да стопира транскрипцията на тези гени. Третирането на туморни клетки с PIBF води до повишаване на секрецията на споменатите фактори, за разлика от действието му при трофобласт. PIBF въздейства и върху Stat3 активацията, като отново има различен ефект при трофобластни клетки, където я инхибира и при туморни клетки, където води до късна Stat3 активация. Това предполага, че в туморните клетки PIBF действа индиректно, чрез други фактор, като всеки един от гореизброените (IL-6, EGF, HB-EGF) може да бъде отговорен за тези ефекти. Установено е, например, че IL-6 активира Stat3, а също така, че потискането на HB-EGF в туморни клетки намалява ефектът на PIBF върху Stat3. (Halasz et al. 2013)

Имайки предвид имуномодулаторния ефект на PIBF и експресията му от редица тумори може да се предположи, че PIBF спомага развитието и прогресията им. Именно за това има изказани твърдения, че супресията на PIBF, може да се свърже с успешната имунотерапия при някои злокачествени тумори. (*Check et al. 2009; Szekeres-Bartho and Polgar 2010*)

## **2.7. ГБМ и транскрипционни фактори (Stat1 и Stat3)**

Естеството на секреторния анти-туморен имунен отговор не може да се определи само от наличието на отделните секреторни фактори и тяхното действие. За да бъде разбрана точната природа на имунния отговор в цялата му многопластовост, трябва да се вземат в предвид всички налични в средата цитокини и техните сложни взаимоотношения, първоначалният стимул за тяхното производство, наличните клетъчните типове и статуса на активиране на присъстващите клетки. (*Wallet et al. 2005*)

Въздействието на цитокините върху техните рецептори, както при нормални условия, така и при малигнени процеси, е само първия етап от сложна система на вътреклетъчна сигнализация, важна част, от която заема т.нар. JAK-Stat сигнален път.

Signal transducers and activators of transcription (Stats) са 5 на брой транскрипционни фактора, които са важни в интрацелуларната сигнализация и участват в JAK-STAT сигналния път. Те се активират от растежни фактори и цитокини като формират димери, чрез фосфорилиране на тирозин, извършвано обикновено от JAK киназите. След това Stats се насочват към ядрото на клетката, за да изпълнят функцията си на транскрипционни фактори и да активират специфичните си прицелни гени. (Haybaeck et al., 2007) Интерфероните (IFNs) и IL-6 са цитокини, които в най-голяма степен предизвикват активация на Stats. (Zhu et al. 2012)

Stat1 е първият открит от тази група белтъци. Той е основен компонент в IFN сигнализацията и е безусловно необходим при развитието на вродения имунен отговор. Установено е, че IFN $\gamma$  активира Stat1, а IFN $\alpha$  – Stat1 и Stat2. (Darnell et al. 1994) Дефицитни по Stat1 мишки проявяват сериозни дефекти в IFN-зависимия имунен отговор срещу вируси и микробни патогени. Това наблюдение показва, че Stat1 е важен основно за IFN-зависимите сигнални пътища. (Akira, 1999) Тези мишки не показват аномалии при развитието си, което дава основание да се счита, че съществуват фактори компенсиращи задействието от IFNs Stat1 сигнални пътища. Stat1 може да се активира и от много растежни фактори като интерлевкините IL-6 и IL-10, растежни хормони и тромбоектин. (Shuai 1999)

Други характеристики на Stat1 са, че той може да служи като инхибитор на растежа и като промотор на апоптозата в нормални и туморни клетки. Дефицитни по Stat1 мишки развиват тумори и са силно чувствителни на химически индуцирана туморогенеза. (Kaplan et al. 1998) Изследвания показват, че активацията на Stat1 в тумори чрез автономни клетъчни механизми или чрез стимулация от фактори на имунната система, може да доведе до по-голям успех при провеждане на химиотерапия. (Laimer et al. 2007) Счита се, че експресията на активиран Stat1 от даден тумор е показател за по-добра прогноза, докато тумори където Stat1 е неактивен са по-устойчиви на апоптоза. (Choi et al. 2003) Haybaeck et al. изследват 46 глиобластоми за Stat1 експресия и установяват такава при голям брой от туморите. Интересното е, че Stat1 се намира в цитоплазмата, а не в ядрата на туморните клетки, което предполага, че сигналните пътища за активация на този фактор не са задействани при по-голямата част от описаните тумори. (Haybaeck et al. 2007)

Има данни, описани при малигнени заболявания за противоположно действие на Stat1 от изложеното до тук. Stat1 и интерферон свързаните гени са идентифицирани като ключови регулатори на устойчивостта на радиация в туморни модели и е установено,

че те се индуцират от радиация при голям брой ракови клетъчни линии, включително и при глиоми. (*Khodarev et al. 2004; Khodarev et al. 2007; Tsai et al. 2007*) Продължителната IFN сигнализация или постоянната Stat1 активация предизвиква туморен растеж и устойчивост на радио и химиотерапия. (*Duarte et al. 2012*) Khodarev et al. изказват хипотеза, че краткотрайната индукция на Stat1 от IFNs или други стресови сигнали активира гени индуциращи клетъчна апоптоза, докато продължителната му експресия предизвиква супресията на тези гени и индуцира гени за преживяемост, които при високи нива на Stat1 правят клетките устойчиви на радиация и други въздействия свързани с клетъчна смърт. (*Khodarev et al. 2007*) Duarte et al. съобщават, че свръхекспресията на IFNs и Stat1 предполага ниска преживяемост при пациенти с ГБМ, като в допълнение те изтъкват, че тази характеристика зависи от субтипа на тумора. Тя е най-силно изявена при пронеурален субтип ГБМ, докато при класическия и мезенхимален субтип не се наблюдава тази зависимост. (*Duarte et al. 2012*)

Stat3 е транскрипционен фактор, медиращ експресията на множество гени в отговор на цитокини, растежни фактори, хипоксия и други екзогенни стимули, като по този начин играе ключова роля в много клетъчни процеси свързани с клетъчен растеж и развитие, апоптоза, регенерация, имуномодулация и канцерогенеза. За разлика от останалите членове на Stat семейството липсата на Stat3 води до летален изход при ембриони, което предполага, че той е с централна роля в Stat семейството. Изследвания върху този фактор при диференцирани тъкани показват, че той участва в широк спектър от физиологични процеси, като изглежда отговаря за напълно противоположни процеси в клетките. (*Levy and Lee, 2002*)

Персистираща Stat3 активация може да доведе до абнормална преживяемост на множество видове клетки и в следствие до туморогенеза. (*Buettner et al., 2002*) Постоянна Stat3 активация е докладвана при 50-90% от човешките ракови заболявания. (*Buettner et al., 2002; Yu and Jove, 2004*) Много изследователски групи установяват над 50% оцветяване за Stat3 при ГБМ, като се докладва и за корелация между хистопатологичната степен на глиалните тумори и Stat3 фосфорилирането. (*Birner et al. 2010; Kim et al., 2014*)

Този транскрипционен фактор е добре познат регулатор свързан с патогенезата на ГБМ. Той повишава пролиферацията на туморните клетки, като ги предпазва от апоптоза, чрез повишени нива на survivin, B-cell lymphoma-extra large molecule (Bcl-xl), Myeloid cell leukemia differentiation protein (MCL), засилена c-мус и cyclin D1/D2

експресия. Активацията на Stat3 стимулира неоваскуларизацията, повишавайки VEGF и Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) експресията и стимулира туморната инвазия, засилвайки MMP-2 и MMP-9 експресията. (Yu et al. 2004; Hodge et al. 2005; Huang et al. 2007; Abou-Ghazal et al. 2008) Наскоро е доказано, че Stat3 регулира растежа и самообновлението на ТСК и той е предложен като нова цел за таргетна терапия при ГБМ. (Heimberger et al. 2009; Sherry et al. 2009; Wei et al. 2010) Инхибирането на Stat3 в клетъчни култури от ГБМ показва постоянна загуба на характеристиките за стволовост, проявявани от ТСК и загуба на белтъците, участващи в хомеостазата на стволовите клетки. (Sherry et al. 2009) Предполага се, че блокирането на Stat3 сигналния път лишава ТСК от способността да поддържат туморния растеж и индуцира диференциацията им. (Wei et al. 2010) ТСК експресиращи CD133+ от пациенти с ГБМ показват постоянна Stat3 експресия и имат силна способност да инхибират Т-клетъчната пролиферация и активация, а също така да индуцират Tregs и да предизвикват Т-клетъчна апоптоза. (Wei et al. 2010, Kinjyo et al. 2006) Блокирането на Stat3 води до възстановяване на Т-клетъчната пролиферация и способността на Т-лимфоцитите да секретират проинфламаторни цитокини. (Heimberger et al. 2009)

Stat3 е и един от ключовите регулатори на процеса на имуносупресия, тъй като активацията му води до потискане на макрофагите, до промяна в дендритно-клетъчните функции и до инхибиране на цитотоксичността на NK-клетките и фагоцитната способност на неутрофилите. (Yu et al. 2007) Асоциираните със Stat3 сигналния път имуносупресивни медиатори основно спадат към две категории: мембранно-свързани протеини и разтворими фактори, които са продуцирани от глиомните клетки и популации от привлечени от тумора имунни клетки. Секретиранияте фактори включват IL-10, VEGF и TGF $\beta$ , които инхибират функциите на Т-, В-, NK-клетки и моноцити. (Kim et al. 2014) VEGF не само стимулира ангиогенезата, но и от своя страна засилва Stat3 активацията в незрели дендритни клетки, което да води до намалена експресия на МНС клас II, ко-стимулаторната молекула CD40 и подтисната IL-12 секреция. (Wang et al. 2004) See et al. демонстрират, че супресията на Stat3 предизвиква освобождаването на IFN $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10), RANTES, IL-8, TNF $\alpha$  и IFN $\beta$ , които водят до ДК-съзряване и активация. (See et al. 2012) Установено е също, че хемокини, секретирани от глиоми предизвикват постоянна активация на Stat3 в TAM, което води до супресия на антитуморните механизми и дори до толеранс към туморните антигени. Komohara et al. съобщават, че процесът при взаимодействието между TAM и ГБМ е двустранен – глиомните клетки активират Stat3 в TAM, които на свой ред продуцират фактори,

активиращи Stat3 в туморните клетки. (Komohara et al. 2012) Подобни взаимодействия се наблюдават и между глиобластомните клетки и Tregs. Активиращият Stat3 сигнален път в туморните клетки води до тяхната способност за привличане и последвала пролиферация на Tregs, както и до тяхната способност за продуцирането на имunosупресивните IL-10 и TGFβ. В туморната среда Tregs изглежда се адаптират, най-вероятно, благодарение на активацията на техния Stat3 сигнален път под действието на туморните клетки. (Kinjyo et al. 2006, Kim et al. 2014)

Някои нови изследвания за Stat3 активацията при ГБМ и други тумори показват, че той може да има и антитуморно действие. Stat3 участва в сигнализацията свързана с инхибиране на туморния растеж, в крайната клетъчна диференциация и апоптоза на малигнените клетки. (Kim et al. 2014) Установено е, че Stat3 активацията супресира малигнената трансформация при някои генотипове ГБМ. Така например De la Iglesia et al. демонстрират, че инхибирането на ендогенния Stat3 при дефицитен за phosphatase and tensin homolog (PTEN) ГБМ стопира Stat3 медираната транскрипционна репресия на IL-8, което, чрез последвалата активация на IL-8, води до повишаване на туморната пролиферация и инвазивност. Реактивацията на транскрипционния фактор Stat3 супресира IL-8 секрецията и съответно инвазивността и пролиферацията на този тип ГБМ. (De la Iglesia et al. 2008)

## 2.8. Заключение

Глиобластома мултиформе е най-често срещаният глиален тумор и е един от най-агресивните познати тумори, който не се поддава на ефективно лечение. Модерните теории за неговото възникване са фокусирани върху трансформацията на невралните стволови клетки и произхождащите от тях прогенитори в туморни стволови клетки. Последните са култивирани *in vitro* по няколко различни начина и частично характеризирани чрез интрацелуларните си и повърхностни маркери, както и чрез способността си да се самообновяват, диференцират и да предизвикват тумори в опитни животни. Според cancer stem cell теорията популацията от ТСК са на върха на йерархията на туморните клетки и са своеобразни „организатори” на тумора. Последните изследвания в областта показват, че смятаните за ТСК показват голяма прилика с мезенхимните стволови клетки при култивирането им като адхерентни клетки, което поставя допълнителни въпроси относно произхода и развитието на ГБМ.

Развитието на глиобластома мултиформе вероятно се подпомага и от мястото, където той възниква, а именно в ЦНС, за която е характерна липсата на силна имунна реакция, с цел да се намалят пораженията върху мозъчната тъкан. Туморната микросреда причинява, както локална, така и системна супресия на имунната система, като ГБМ използва механизми, естествени за организма, насочвайки ги в благоприятна за него посока. При този тумор се наблюдава привличане на имуносупресивни популации, експресия и секреция на имуносупресивни молекули и привеждането в толерогенно състояние на различни популации от имунни клетки. Въпреки, че в туморното обкръжение се установява антитуморен имунен отговор, механизмите на имунна супресия преобладават. Получените резултати относно природата на туморните стволови клетки, ролята и действието на привлечени или локално променени клетъчни субпопулации и на използваните от тумора фактори в процеса на имунна супресия, както и липсата на задоволителен успех от прилаганите терапии, води до извода, че са необходими още изследвания, за да се допълнят знанията ни за случващото се в туморните клетки и в туморната микросреда.

### 3. Цел и задачи

Справката с литературни данни, които нашият екип направи и фактът, че ГБМ при българската популация е слабо изследван, определи като основна цел на нашето изследване характеризирането на клетки, изолирани и култивирани от ГБМ по отношение на техните свойства на туморни стволови клетки и приликите им с мезенхимни стволови клетки, както и способността им да потискат имунния отговор. Наред с това, допълнителна цел на нашето изследване беше да проучим инфилтрацията на тумора с някои от клетките на имунната система, както и експресията на някои фактори ангажирани в туморното оцеляване.

Задачите, които си поставихме, за да изпълним поставените цели, бяха следните:

1. Да се установи има ли инфилтрация на тумора от антиген представящи клетки и да се изследва състоянието им.
2. Да се изследва инфилтрацията на тумора от NK-клетки и Т-лимфоцити
3. Да се изследва експресията на Stat3 от клетките на хистологично доказани глиобластоми.
4. Да се разработи метод за култивиране на клетки, получени от тъканни проби от хистологично доказани глиобластоми
5. Да се изследват получените клетъчни култури за експресия на ТСК маркери – Nestin, GFAP, Sox-2, CD133 и CD44.
6. Да се изследва способността за самообновление на получените клетъчни култури.
7. Да се установи в получените клетъчни култури експресията на транскрипционния фактор Stat1.
8. Да се изследва цитокиновата секреция на получените клетъчни култури.
9. Да се изследва способността на получените клетъчни култури да потискат чрез секреторни фактори периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMCs), изолирани от здрави донори.
10. Да се изследва способността на ГБМ клетъчни култури да експресират маркери, характерни за МСК и възможностите им за диференциация в мезенхимна посока.

## 4. Материали и методи

### 4.1. Изследвани лица и биологичен материал

За целите и задачите на настоящата работа бяха изследвани проби от общо 194 пациента с хистологично доказана диагноза глиобластома мултиформе и 8 здрави лица. Хистологичната диагноза беше поставена в Лаборатория по клинична патология и невропатология „Проф. Сашо Божинов“ към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, гр. София. Всички пациенти и здрави донори подписаха предварително Информирано съгласие, съгласно изискванията на Комисията по етика на научните изследвания към МУ-София. Личните данни и резултатите от изследването са съхранявани, обработвани и представяни в съответствие със Закона за защита на личните данни в сила от 01.01.2002г., изм. ДВ. бр.57 от 13 юли 2007 г. Резултатите от проучването за всеки пациент поотделно са съхранявани в съответствие с действащия в момента Кодекс на професионалната етика - Раздел IV - Лекарска тайна - чл.51 -чл.55 и закона, действащ в република България.

За клетъчно култивиране и фенотипизиране на инфилтриращи ГБМ имунни клетки бяха изследвани материали от 28 пациента (16 мъже и 12 жени) на възраст от 42 до 74 години, които ни бяха предоставени от колегите от Клиниката по неврохирургия към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, гр. София. Материалите представляваха свежа тъкан 1-2 см<sup>3</sup>, получена при стандартно оперативно отстраняване на тумора, като пробата беше изрязана от солидната туморна зона, описана като „жизнен регион, който поема контрастна материя, не се характеризира с клетъчен разпад и некроза и е свързан с нарастване и инвазия на тумора към подлежащата „здрава“ мозъчна тъкан” (*Piccirillo et al. 2012*). В случаите, когато от един пациент бяха вземани по две проби, определени като проба от централната и периферната част на тумора, пробата от централната част отговаряше на определението „изрязана от солидната част на тумора“, докато другата проба беше изрязана в близост до тъкан, определена като нормална нервна тъкан. Веднага след операцията пробата беше поставяна в стерилен фосфат буфериран разтвор (PBS) с Ph7,4 и беше доставяна в Лабораторията по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, където беше съхранявана до 3 часа на стайна температура преди последващата ѝ обработка.

С цел изследване на супресивното действие на клетки, култивирани от ГБМ върху имунокомпетентни клетки чрез рутинна венепункция беше взета периферна венозна кръв от 8 здрави донора, които бяха запознати с целите, за които ще се използва даденият от тях биологичен материал.

За имунохистохимичното изследване на Stat3 при ГБМ бяха използвани материали, взети при хирургическа интервенция, от 166 пациента с хистологично доказана диагноза ГБМ, от които бяха изработени 195 хистологични блока. Общият брой на диагностицираните хистологични материали надвишава този на пациентите, тъй като при някои пациенти са проведени 2 или 3 операции. За експериментите бяха използвани хистологични блокове и хистологични срезове от периода 2004-2008 г., съдържащи материал от ГБМ, предоставени от архива на Лаборатория по клинична патология и невропатология към УМБАЛ "Св. Иван Рилски", гр. София. Имунохистохимичните изследвания на Stat3 са извършени и публикувани в етап предхождащ времето на докторантурата, като съавторите ми дадоха съгласие да използвам необходимите ми данни от общата ни работа. Този подход се възприе поради изключителната логична връзка с получените впоследствие резултати.

#### **4.2. Фенотипизиране на имунни клетки, инфилтриращи ГБМ**

От Клиника по неврохирургия към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, гр. София бяха предоставени материали от 12 пациента с хистологично доказана диагноза ГБМ. Получената при оперативно отстраняване на тумора свежа тъкан, ни беше предоставена в стерилен PBS и беше обработвана до няколко часа след получаването ѝ.

При част от пациентите изследвахме материал, взет от периферната и централната част на тумор, като двете проби бяха обработени по напълно еднакъв начин.

Всяка от останалите проби беше изрязана от описаната в т. 4.1. солидна част на тумора.

За всеки материал следвахме следната процедура:

#### 4.2.1. Изолиране

Изолирани бяха клетки от ГБМ, като парче тъкан с размер 3-4 см беше хомогенизирано чрез механично раздробяване и нарязване. След това към получената маса беше добавяна 1,5 мл колагеназа тип IA (2.5 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA) и пробата беше инкубирана в CO<sub>2</sub>-инкубатор Thermo Scientific Heracell 150i на 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност за 1 час на клатачка (Mini Rocker-shaker MR-1, BioSan<sup>Ltd</sup>). Сместа беше прекарвана през сито 70µm (Nylon cell strainer, Vecton Dickinson, USA) и беше поставяна в 50 мл епруветка, а парчетата, задържани в ситото, бяха натискани с бутало от спринцовка с цел пълното им преминаване през ситото. Епруветката беше допълвана до 45мл със среда DMEM съдържаща 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclon FBS, Thermo Scientific), след което получената клетъчна суспензия беше центрофугирана на 2000 об. за 10 минути в центрофуга Hettich Universal 320 R. Надутайката беше изхвърляна и беше добавян 2 мл лизиращ разтвор в работна концентрация (Lysing Solution, BD, USA) за 10 минути. Клетъчната суспензия беше центрофугирана на 2000 об. за 5 минути. След измиване със Cell Wash буфер (BD Biosciences, USA) епруветката беше допълвана до 45 мл със същия разтвор и отново се центрофугира на 2000 оборота за 5 минути. Надутайката беше изхвърляна, а получената утайка беше разреждана 1:10 с Cell Wash (100 мкл от утайката в 1 мл Cell Wash).

#### 4.2.2. Маркиране на клетки, изолирани от ГБМ със специфични антитела и флоуцитометричен анализ

Извършено беше повърхностно маркиране на изолираните клетки със специфични моноклонални антитела. За да бъдат определени двойно положителните зрели антиген-представящи клетки и тяхната експресия на B7 комплекса, бяха използвани следните моноклонални антитела CD83 FITC (Cat.№ 556910, BD, USA), HLA-DR PE (Cat.№ 1639, Immunotech, USA) CD80 PE (Cat. № 557227, BD, USA) и CD86 PE (Cat. № 555665, BD, USA).

За да се определят наличните NK-клетки и Т-лимфоцити бяха използвани CD3FITC/CD16PE + CD56 (Cat№ 340182, BD, USA).

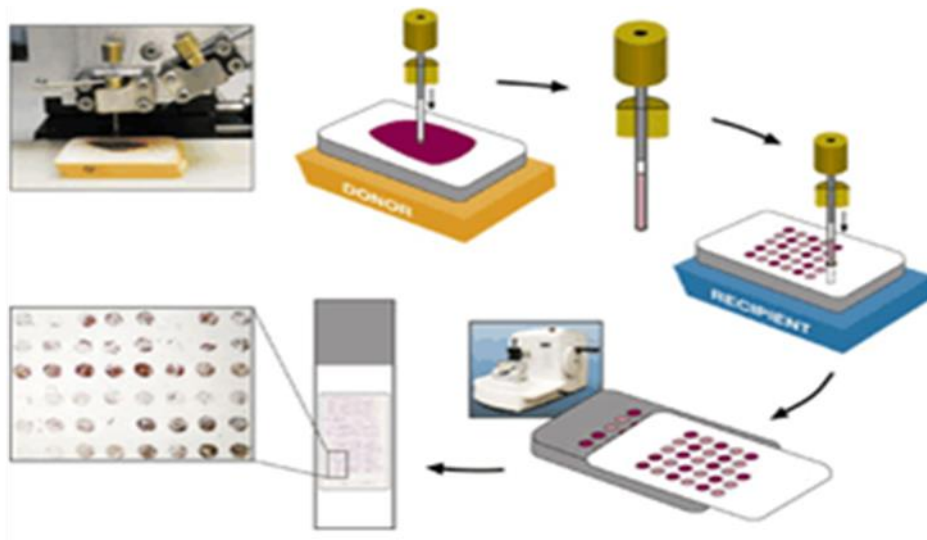
Всяка група антитела беше поставяна в отделна флоуцитометрична епруветка (5ml Polystyrene Round-Bottom Tube 12x75 mm, BD, USA) (по10 µl от всяко антитяло), към тях беше добавяна 100 µl от получената разрежданата утайка и бяха инкубирани 15

минути на стайна температура, на тъмно. След това клетките бяха измивани с 2 мл Cell Wash и центрофугирани на 1200 оборота за 5 минути. Надутайката беше изхвърляна, а утаените клетки бяха фиксирани в 500 µl фиксиращ разтвор (CellFIX, BD, USA). За всеки тест бяха използвани съответните отрицателни контроли представляващи немаркирана периферна кръв. Резултатите бяха отчетени от флоуцитометър FACS Calibur (BD), а за анализ на данните беше използвана програма CellQuest. Бяха събирани по 10 000 събития за всяка проба, като след това беше отчетен процентът на клетките, експресиращи даденото антитяло, в сравнение с изотипната контрола. За флоуцитометричния анализ на имунните клетки, инфилтриращи ГБМ, беше използван модифициран протокол на *Hussain et. al. 2006*, като за анализа на антиген-представящите клетки беше направен гейт върху CD83 и HLA-DR двойно позитивните клетки, който съответно беше проектиран върху друг плот, отчитащ експресията на CD80 и CD86, изграждащи B7 комплекса. По отношение на Т-лимфоцитите и NK-клетките беше гейтирано върху отрицателните за CD3 клетки и този гейт беше проектиран върху плот показващ експресията на CD16 и CD56.

### **4.3. Имунохистохимично изследване на хистологични срези от ГБМ за експресия на Stat3**

#### **4.3.1. Tissue MicroArray**

Tissue MicroArray (ТМА) е метод на релокализация на тъкани от налични хистологични парафинови блокове върху един общ блок, което позволява наблюдението им върху един хистологичен срез. Предимството на този метод е, че прави възможно наблюдението на тъкани от много пациенти (в някои случаи дори повече от 1000), както и на различни тъкани върху един срез. ТМА намалява многократно количеството на използваните при различни изследвания реагенти, както и обема на обработваните материали. (Фиг. 1) (Kallioniemi et al. 2001)



Фиг. 1 Техника за изработване на ТМА блокове.

ТМА блоковете бяха изработени като предварително беше подготвен парафинов блок с размери около 2,5 на 4 см. В него с биопсична игла (ф 5мм) бяха изрязани 20 отвора (4 на широчина и 5 на дължина). Предметни стъкла и парафинови блокове с включен биологичен материал на пациенти с диагноза ГБМ бяха предоставени от архива на Лаборатория по клинична патология и невропатология към УМБАЛ "Св. Иван Рилски" ЕАД, гр. София. По предметното стъкло на всеки материал, при наблюдение под светлинен микроскоп, беше определено точното място, от което ще бъде взет материал, за включване в ТМА блока, като беше избрано такава, в която преобладават анапластични астроцити, без или с минимални некрози и засилена микровазална пролиферация. От определеното място с биопсична игла ф 5мм беше изрязван материал, който беше поставян в един от отворите в предварително изработеният ТМА блок. За контрола, използвахме материал от свински черен дроб, който беше включен в парафинов блок според стандартен протокол, използван в Лаборатория по клинична патология и невропатология за обработка и включване на материали от мозъчна тъкан. Контролната проба беше изрязана по същият начин и беше поставена в горен десен ъгъл на всеки блок. Всеки блок беше надписан и беше създаден списък с материалите, които включва.

#### 4.3.2. Нарязване, депарафиниране и антигенно възстановяване

От ТМА блоковете бяха нарязани на микротом Leika (Germany) срезове с дебелина 5µm и бяха монтирани върху предметно стъкло. Предметните стъкла, върху които бяха положени срезове за имунохистохимични изследвания, бяха обработени с адхезивен разтвор, съдържащ 3-Triethoxysilyl-propylamin. Въвеждането на тази стъпка е наложително поради агресивните методи, които се използват впоследствие и възможното отлепване на срезове от предметните стъкла. Депарафинирането и рехидратацията на срезове беше извършено в ксилол (три кювети по 5 мин. във всяка), последвано от плакнене в редица от етанол (абсолютен, 96%, 80% по 10 мин.) и двукратно измиване с дестилирана вода по 5 мин. Антигенно възстановяване на епитопите на срезове беше извършено чрез обработка на водна баня при T 95°C – 100°C. Точните условия, при които се достига до максимално антигенно възстановяване, бяха установени чрез прилагане на техниката Test Battery, при която бяха използвани буфери с различно рН: Tris-HCl рН2, Цитратен буфер рН6, ЕДТА рН9 и различен период на престой на предметните стъкла в буферите. (Таблица 3)

Таблица 3 Test battery – вариации на рН и на време за антигенно възстановяване.

	15 мин	30 мин	60 мин
рН 2	1 срез	1 срез	1 срез
рН 6	1 срез	1 срез	1 срез
рН 9	1 срез	1 срез	1 срез

Беше установено, че най-добро антигенно възстановяване за Stat3 се получава при обработка с ЕДТА рН9 за 60 мин. Впоследствие всички срезове бяха обработени по този начин.

#### 4.3.3. Имунохистохимично оцветяване

Антигенното възстановяване беше последвано от имунохистохимичен анализ. За намаляване на фона срезове бяха обработени с 3% водороден пероксид за 10 мин. и бяха промити 2 пъти с дестилирана вода за по 5 мин. Следваше измиване с Wash buffer (10xTBS – Tris buffered saline) и добавяне на 120µl блокиращ разтвор (5% normal goat serum, Thermo Fisher Scientific, USA) за 30 мин. на стайна температура. След

отстраняването на блокиращия разтвор беше добавяно първото моноклонално антитяло – rabbit anti Phospho-Stat3(Tyr705) (Cell Signaling Technology, USA), по 110µl към всеки срез, разтворено в съотношение 1:50, което беше икубирано цяла нощ на температура 4°C. Срезове бяха оцветени по система ONE Detection System на Thermo Scientific™ Lab Vision™ UltraVision™, USA, спазвайки стриктно изискванията на фирмата производител. След измиване на срезове с Wash buffer два пъти по 5 мин. беше добавен HRP Polymer към всеки срез за 30мин. След това срезове отново бяха измити и беше добавен DAB Plus Chromogen за 10-15мин. Контрастно оцветяване беше извършено с разтвор на Hemalun (2-3 мин.) и изплакване под течаща вода до придобиване на небесно син цвят от срезове. Срезове бяха изсушени и включени в монтираща среда – нисковискозна монтираща среда за микроскопия Dd Mount (DDK, Italy). За наблюдение на реакцията беше използван микроскоп Olympus BX51.

#### **4.4. Култивиране на клетки, изолирани от ГБМ**

От Клиника по неврохирургия към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София бяха предоставени материали от 15 пациента с хистологично доказана диагноза ГБМ. Материалите бяха получени при същите условия като описаните в т. 4.2. За изолирането на клетки от ГБМ беше спазена същата процедура като описаната в т. 4.2.1., но беше извършено при стерилни условия в стерилен ламинарен бокс Thermo Scientific клас II, а растежът на клетките беше проследяван под инвертен микроскоп (Micros, Austria). Лизиране на клетките с 2мл лизиращ разтвор за 7-8 мин. беше прилагано само при наличието на силна хемолиза. За измиване на клетките беше използван стерилен физиологичен разтвор. Преди да бъдат посетени клетките бяха адаптирани в хемцитометър на Bürker. Клетките бяха разреждени с 1мл PBS, след което от вече разредените клетки бяха взети 10µl и бяха добавени към 100 µl PBS. От последните бяха взети 20µl, които бяха поставени в камерата. Броят на клетките бе определен от квадратите по двата диагонала на камерата плюс един квадрат извън диагоналите (общо 25 квадрата), равняващи се на общ обем от 0.1 mm<sup>3</sup>. При изброяването на клетките беше спазвано правилото на Bürker: във всеки квадрат се изброяват клетките намиращи се вътре в квадрата и които докосват отвън или отвътре две сключващи помежду си ъгъл страни на квадрата. Броят клетки в 1 ml е равен на

броя изброени клетки умножени по коефициента на разреждане и по коефициента на Bürker -  $10^4$ . За определяне броя на клетките се вземаше средно аритметичната сума от две преброявания на клетки в камерата на Bürker.

Средно концентрацията на клетките при нашите експерименти, свързани с клетъчно култивиране беше  $1-5 \times 10^6$  кл./мл.

След изолирането към получената клетъчна суспензия беше добавян още 11мл PBS, като клетките бяха добре ресуспендирани и разделени на три (по 4мл) в 15 мл епруветки. Епруветките бяха центрофугирани на 2000 об. за 10 мин., след което надутайката беше отливана. Към първата епруветка беше добавяна 9 мл среда Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, PAA, Austria) с фактори EGF(Abcam, GB), bFGF(Abcam, GB) и B27 suplement (Life technologies, USA) за култивиране на невросфери, към втората – 9мл среда с фактори EGF и bFGF и 10% FBS за получаване на адхерентни клетки по наш протокол, а към третата беше добавена среда само с 10% FBS за получаване на адхерентни клетки по стандартен метод. Клетките в трите епруветки бяха добре ресуспендирани, след което бяха разпределяни в 24-ямкови полистиренови плаки (SPL Life Sciences, Korea) – клетъчната суспензия от всяка епруветка беше разпределена в 3 ямки по 3 мл. Плаката беше поставяна в термостат CO<sub>2</sub>-инкубатор Thermo Scientific Heracell 150i на 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност. Средата на адхерентните клетъчни култури беше подменяна частично на всеки 2 дни, като след оформянето на монослой клетките бяха отлепени чрез трипсинизиране (0,05% Trypsin – 0,02% EDTA, Biowest, France) – по 500µl на ямка за 1 мин. Ензимното действие на трипсина беше прекратявано с добавяне на DMEM, съдържаща 10% FBS при съотношението трипсин : културална среда = 1 : 5, след което клетките бяха прехвърляни в 25 см<sup>2</sup> PVC фласкове (SPL, Korea) с 6 мл от съответната среда за култивиране. След формиране на монослой клетките бяха трипсинизирани (0,05% Trypsin – 0,02% EDTA, Biowest, France) с 1 мл на флак за 1 мин. до едноклетъчна суспензия и подложени на анализ. Супернатантата от клетъчните култури беше събрана, разфасована и съхранена на -70°C в хладилник Panasonic Ultra Low Temperature Freezer MDF-U33V.

При експериментите с невросфери след формирането на такива заемащи повече от 2/3 от фласка, те бяха изтегляни заедно със средата с помощта на пастърна пипета. След това бяха ресуспендирани, механично раздробявани, центрофугирани на 1200об./5мин. и, след отливане на средата, допълнително разбивани и подлагани на анализ.

#### 4.4.1. Използвани среди за клетъчно култивиране

Средите бяха приготвени при стерилни условия със стерилни шишета, пипети и връхчета.

Среда за култивиране на невросфери:

Към 90мл DMEM беше добавян 10 мл фетален телешки серум, за да се достигне краен обем от 100мл. Към така получената среда бяха добавяни 200µl EGF, 20µl FGF, 2мл B27 suplement и 1мл Antibiotic/ Antimycotic (PAA Laboratories, Austria)

Среда за култивиране на адхерентни клетки по класически метод:

Към 90мл DMEM беше добавян 10 мл фетален телешки серум, за да се достигне краен обем от 100мл. Към така получената среда беше добавен 10мл FBS и 1мл Antibiotic/ Antimycotic (PAA Laboratories, Austria).

Среда за култивиране на глиобластомни клетки по наш метод:

Към 90мл DMEM беше добавян 10 мл фетален телешки серум, за да се достигне краен обем от 100мл. Към така получената среда бяха добавяни 200µl EGF, 20µl FGF, 10мл FBS и 1мл Antibiotic/ Antimycotic (PAA Laboratories, Austria).

След направата им средите бяха филтрувани. Това ставаше със стерилна спринцовка, на която се завива филтър 22µm (Orange, Belgium), като филтруваната среда беше съхранявана в стерилно шише. Тя беше оставяна в инкубатор на 37<sup>0</sup>C за една нощ, за да се провери стерилността ѝ.

#### 4.5. Изследване експресията на маркери, характерни за ТСК, от ГБМ клетъчни култури

Маркерите, на които нашият екип се спря и за които в научната литература има достатъчно достоверни данни, че се експресират от туморните стволови клетки, изолирани от ГБМ са Nestin, GFAP, Sox-2, CD44 и CD133. Всички те бяха изследвани флоуцитометрично, а вътреклетъчните маркери Sox-2 и Nestin и чрез конфокална микроскопия. За изследването на GFAP наред с флоуцитометрията беше използван и RT-qPCR.

#### 4.5.1. Изследване чрез флоуцитометрия

##### *Изследване на повърхностни клетъчни маркери*

Клетъчни култури от ГБМ (невросфери и АК, отглеждани, както по класически, така и по наш протокол) първи пасаж бяха трипсинизирани и изследвани за наличие на повърхностните маркери CD133 и CD44 чрез специфични моноклонални антитела CD133/2 (293C3) pure anti-human (Miltenyi Biotec, Germany) и anti-human CD44 (BD Pharmingen, USA).

При изследване на АК супернатантата беше отстранявана от флашка, след което клетките бяха промивани със стерилен PBS. Беше добавян 1мл трипсин за 1мин. След инкубацията бяха добавяни 5мл среда с EGF, bFGF и 10% FBS. Клетките бяха събирани от флашка в 15мл епруветка и центрофугирани на 1400об. за 10мин. Супернатантата беше отливана, след което клетките бяха промивани с 5мл Cell Wash и центрофугирани на 1200об. за 5 мин. Клетките бяха разреждани 1:10 със Cell Wash (към 100µl клетъчна утайка се добавя 1мл Cell Wash). В две флоуцитометрични епруветки бяха поставяни по 10µl от всяко анти тяло и по 100µl от разредените клетки (Напр.: епруветка 1- 10µl CD44, епруветка 2 - 10µl CD133). За отрицателна контрола, служеше проба със същото количество клетки, обработвани по същия начин, но без наличие на антитела. Клетките бяха вортексирани и инкубирани на стайна температура, на тъмно за 15 мин. Следваше миене с 2мл Cell Wash и центрофугиране за 10мин. на 1200об. Утайката беше отливана, а клетките – вортексирани. При изследването на CD133 използвахме немаркирано anti-CD133 анти тяло, поради което се наложи индиректно маркиране, осъществено чрез добавяне на второ анти тяло – anti-mouse FITC (eBioscience, USA, Cat.№ 11-4011-85), като клетките бяха инкубирани 40 мин. на тъмно. След инкубацията клетките бяха промивани с 2мл Cell Wash, центрофугирани на 1200об./10мин и утайката беше отливана. Клетките бяха фиксирани с 400мл фиксиращ разтвор (BD CellFIX, BD Bioscience, USA).

Резултатите бяха отчитани на флоуцитометър FACS Calibur (BD), а за анализ на данните беше използвана програма CellQuest. Бяха събирани по 10 000 събития за всяка проба, като след това беше отчитан процентът на клетките експресиращи даденото анти тяло в сравнение с контролните клетки.

### *Изследване на вътреклетъчни маркери*

Клетъчни култури от ГБМ бяха култивирани до 1 пасаж, трипсинизирани и изследвани за наличие на вътреклетъчните маркери Nestin, GFAP и Sox-2 чрез anti-Nestin PE (eBioscience, USA), anti-Sox-2 PerCP (eBioscience, USA), anti-GFAP Alexa Fluor488 (eBioscience, USA). Процедурата за трипсинизиране и събиране на клетките от флашка е същата като тази описана в т. 4.4. Получената клетъчна утайка след последното измиване отново беше разреждана 1:10 с Cell Wash (към 100µl клетъчна утайка се добавя 1мл Cell Wash) Тъй като се търси експресия на интрацелуларни маркери, беше извършено пермеабилизиране на клетъчните мембрани с BD Cytofix/Сytoperm Fixation/Permeabilization kit (BD Biosciences, USA), като се следваха стриктно изискванията на производителя. Клетките бяха ресуспендирани добре и беше добавян по 250µl Fixation/Permeabilization solution, след което бяха инкубирани за 20 мин. на 4 °C в хладилник. После клетките бяха измивани с 1мл предварително разреден с дестилирана вода BD Perm Wash (10x), центрофугирани на 1200об/5мин. и надутайката беше отливана. Следваше двукратно промиване със Cell Wash и центрофугиране. След пермеабилизирането бяха добавяни по 10 µl от моноклоналните антитела срещу Sox-2, Nestin и GFAP и клетките бяха инкубирани за 30мин, като за контрола бяха използвани немаркирани клетки. Клетките бяха измивани два пъти с по 2мл Cell Wash, центрофугирани на 1200об/5мин., надутайката беше отливана, а клетките вортексирани. Накрая клетките бяха фиксирани с 400µl фиксиращ разтвор. Отчитането беше извършвано на флоуцитометър FACS Calibur (BD), а за анализ на данните беше използвана програма CellQuest и WinMDI 2. Бяха събирани по 10 000 събития за всяка проба, като след това беше отчетен процентът на клетките експресиращи даденото анти тяло в сравнение с контролните клетки.

### **4.5.2. Изследване чрез флуоресцентна конфокална микроскопия**

Клетъчни култури от ГБМ бяха култивирани до 1 пасаж, трипсинизирани като беше следвана процедурата за трипсинизиране и събиране на клетките, описана в т. 4.4. Събраните клетки бяха прехвърляни на стъкълца, където растяха на 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, докато образуват монослой, след което бяха промивани с PBS, Ph 7.4 и фиксирани с 4% параформалдехид в PBS, Ph 7.4 за 20 мин. на стайна температура. След трикратни промивания за 5 мин. с PBS, Ph 7.4, клетките бяха едновременно пермеабилизирани и блокирани с 0.1% Triton X-100 (Sigma, USA) и 1% BSA (bovine serum albumin, Sigma,

USA) в PBS, Ph 7.4 за един час на стайна температура. След промиване с PBS, Ph 7.4, стъкълцата бяха инкубирани за една нощ на 4<sup>0</sup>C със следните антитела: козе anti-Sox-2 (1:50, R&D Systems, USA), моноклонално anti-Nestin (1:100, R&D Systems, USA) и PBS като контрола. На сутринта стъкълцата бяха промивани с PBS, Ph 7.4 и инкубирани за 1 час на стайна температура със съответните втори антитела: anti-Nestin, и anti-козе Alexa Fluor 594 (1:1000, Invitrogen, USA) за anti-Sox-2. След двукратно промиване с PBS, Ph 7.4, клетъчните ядра бяха оцветени с Hoechst 33258 (1: 1000, Sigma, USA) за 5 минути и след промиване бяха монтирани в Flouromount-G (Southern Biotecch, USA). Флуоресцентните проби бяха анализирани чрез конфокален лазерен сканиращ микроскоп (Leica TCS SPE, Germany).

#### 4.5.3. Изследване на GFAP чрез RT-qPCR

RT-qPCR методът е подробно описан в т. 4.7. Използвани бяха следните праймери:  
GFAP - 50-CCTCTCCCTGGCTCGAATG-30 (прав)  
50-GGAAGCGAACCTTCTCGATGTA-30 (обратен)

#### 4.6. Изследване способността за клоногенност на клетъчни култури от ГБМ

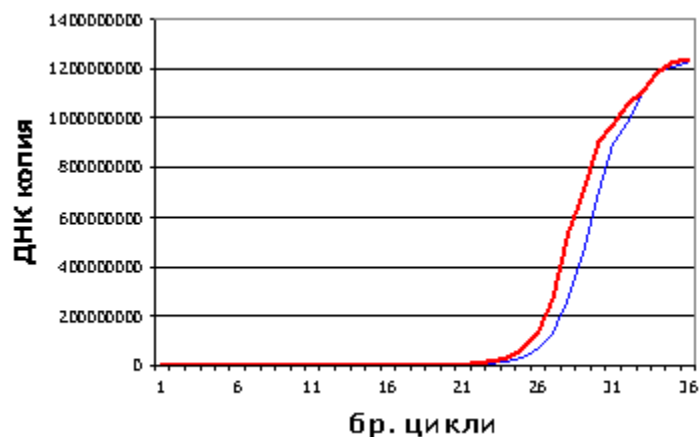
Тестът за клоногенност е класически подход за установяване на стволови или прогениторни клетки в дадена тъкан. Клетките от ГБМ клетъчни култури (пасаж 2, над 80% конфлуентност) бяха трипсинизирани, преброени и ресуспендирани в културелна клетъчна среда DMEM/F-12, EGF 20 ng/ ml, bFGF 20 ng/ml и 10% FBS. Впоследствие клетките бяха преброени и посети в гъстота 300 клетки/cm<sup>2</sup> в шестямкови плаки (Orange Scientific, Belgium). Култивирането протичаше в продължение на 14 дни при 37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub>. Хранителната среда беше подменяна на всеки 3 дни. Ежедневно беше извършвано микроскопско наблюдение, за да се проследи произхода на всеки клон от единична клетка. Две седмици след посяване на клетките, формиралите се клетъчни колонии бяха промивани двукратно с ледено студен физиологичен разтвор. След това клетките бяха фиксирани с изстуден неразреден разтвор на метанол за 15 мин. на 4<sup>0</sup>C. След премахването на метанола клетките бяха оцветявани с 0.5% Crystal violet в 25% метанол за 10 мин. на стайна температура. Клетките бяха промивани трикратно с

дестилирана вода. Наличието на клетъчни колонии беше установено с помощта на инвертен светлинен микроскоп (Leica, Germany) и фотографирано посредством цифрова фотокамера Canon Powershot G1X. При изчислението на клоногенна ефективност на ГБМ клетъчни култури бяха взети предвид само колонии състоящи се от минимум 20 клетки. Колониите бяха преброени в 3 повторения и беше изчислена клоногенна ефективност (ЕК) по следната формула:

$$\text{ЕК}[\%] = \frac{\text{броя на преброените колонии}}{\text{броя на посятите клетки} \times 100}$$

#### 4.7. Молекулярно-генетични методи за определяне на генна експресия на Stat 1 от клетъчни култури от ГБМ. Сравнителен количествен PCR в реално време (quantitative Reverse-Transcription PCR)

Количественият RT-PCR в реално време (qRT-PCR) ни позволява да намножим точно този участък от генома, който ни интересува и да наблюдаваме как се увеличава броят на копията на интересуваният ни продукт през цялото време на реакцията. Целта на този метод е да се получи смес от ДНК молекули, в която концентрацията на изследваната нуклеотидна последователност е многократно по-голяма от тази на всички останали секвенции. (Фиг. 2) Чрез qRT-PCR можем да отчетем разлики в началните количества на матрицата в различните проби.



Фиг. 2 Амплификационен плот, отразяващ количеството ДНК копия срещу броя на PCR циклите.

Клетъчни култури от ГБМ бяха култивирани до първи пасаж и трипсинизирани като беше следвана процедурата за трипсинизиране и събиране на клетките, описана в т. 4.4. За да бъде определено нивото на генна експресия на транскрипционен фактор Stat1 в клетъчни култури от ГБМ, бяха извършени следните етапи:

1. Първоначално беше изолирана тоталната РНК от клетъчните култури, като беше използван TRI Reagent (Sigma Aldrich, USA).

TRI Reagent е бърз и удобен за използване реагент за едновременно изолиране на РНК, ДНК, и протеини, който позволява едноетапно разделяне на течност на тези три компонента. Този продукт е смес от гуанидин тиоцианат и фенол в монофазен разтвор, който ефективно разтваря ДНК, РНК и протеин в хомогенизирани или лизирани тъканни проби. След прибавяне на хлороформ или 1-бromo-3-хлоропропан и центрофугиране, сместа се разделя на три фази: водна фаза, съдържаща РНК, междинна, съдържаща ДНК, и органична фаза, съдържаща протеини. Всеки компонент след това може да бъде изолиран.

1мл TRI реагент е достатъчен за изолиране на РНК от 10 cm<sup>2</sup> на клетъчни култури, отгледани в монослой. Този метод изолира РНК с дължина 0.1–15 kb.

Процедура на метода:

- Трипсинизирани от 25cm<sup>2</sup> матрак клетъчни култури от ГБМ бяха преместени в стъклена петри по препоръка на производителя, където към тях беше добавен 2,5 мл TRI Reagent. Клетките бяха ресуспендирани до получаване на хомогенен лизат и бяха оставени 5 min на стайна температура. Клетките бяха ресуспендирани отново, събрани в епруветка и към тях беше добавен 0,5 ml хлороформ (AppliChem, Germany). След като епруветката беше старателно затворена, получената суспензия беше силно разклащана за 15 секунди и оставяна да престои 10 мин. на стайна температура. Клетъчната суспензия беше центрофугирана на 12,000 g за 15 мин. при температура 2–8 °C (Rotanta 460, Hettich, Germany), при което беше разделена на описаните по-горе слоеве.
- РНК беше изолирана, като първо водната фаза беше преместена в нова епруветка и към нея беше добавян 1,250 ml isopropanol (Genaxxon, Germany). Епруветката беше разклатена и оставена за 10 min на стайна температура. Следваше центрофугиране на 12,000 g за 10 мин. на 2–8 °C. Супернатантата беше отстранявана и получената

гелоподобна утайка с тотална РНК беше измивана с 3 мл 75% етанол (Sigma-Aldrich, USA). Следваше вортексирание и центрофугиране при 7,500 g за 5 min на 2–8 °C.

РНК беше изсушавана за кратко на въздух, като не се позволяваше да изсъхне напълно (7-8 мин). Беше добавяна 40 µl RNase-free water (Thermo Scientific, USA) и беше инкубирана за 10 мин. на 60 °C при постоянно разбъркване, за да се улесни разтварянето ѝ.

2. Получената тотална РНК беше превърната в копи-ДНК чрез верижна полимеразна реакция с обратна транскрипция (RT-PCR), като беше използван Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for qRT-PCR (Thermo Scientific, USA).

Използвани реагенти, предоставени в кита: Maxima Enzyme Mix, 5X Reaction Mix, чиста от нуклеази вода, reaction buffer, dNTPs, oligo (dT)18 и random hexamer primers (случайни хексамерни праймери). Беше използван апарат: PTC-100 (MJ Research Inc., USA)

Този кит е оптимизиран за синтез на копи-ДНК (кДНК) при прилагане на двустепенен метод на qRT-PCR. Комплектът използва Maxima Reverse Transcriptase, ензим, който се отличава с висока термоустойчивост, здравина и повишена способност за синтез на ДНК в сравнение с дивия тип M-MuLV RT. Този кит е способен да задейства синтез на кДНК от широк спектър от изходна РНК (PG 1 - 5 µg) при повишена температура (50-65 °C). Рекомбинантният RiboLock™ RNase Inhibitor ефективно защитава, обработваната РНК от разграждане от РНази А, В и С при температура до 55°C. Китът разполага, както с олигонуклеотидни праймери (oligo(dT)18), така и със случайни хексамерни последователности. Последните се свързват неспецифично и се използват за синтеза на кДНК от всички матрични РНК-и (мРНК) в тоталната РНК-популация. Олигонуклеотидните праймерите селективно се свързват към 3`-края на поли(А)-РНК, синтезирайки копи-ДНК единствено от мРНК, притежаваща поли(А)-опашка. Синтезираната по този начин кДНК може да бъде използвана директно като темплейт за PCR в реално време. Компонентите на кита се размразяват, миксират и се държат на лед преди употребата им.

- Синтез на едноверижна копи-ДНК.

От реактивите на кита в стерилна, чиста от РН-ази епруветка беше изготвена реактивна смес в реда от следната таблица:

5X Reaction Mix -	4 $\mu$ L
Maxima Enzyme Mix -	2 $\mu$ L
Template RNA 1 pg	10 $\mu$ l
Water, nuclease-free	до 20 $\mu$ L
Total volume	20 $\mu$ L

Реактивната смес беше миксирана внимателно и центрофугирана. Беше добавена изолираната от предния етап РНК и беше инкубирана за 10 мин на 25°C (разгъване на праймерите), а след това 15 мин. на 50°C (синтез на кДНК). Реакцията беше прекъсвана чрез нагряване на 85°C за 5 мин.

Получената като продукт копи-ДНК може да бъде директно използвана за qRT-PCR. Като качествен контрол на реакцията бяха използвани необходимите контроли – негативна контрола за обратна транскриптаза и контрола без РНК.

3. На третият етап беше извършено размножаване на таргетната ДНК за Stat1. Изявата на генна експресия на таргетната ДНК отразява и нивото на матрична РНК, която е била синтезирана първоначално локално в клетъчните култури. PCR реакцията беше извършена на апарат Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, USA), като беше използван Luminaris Color HiGreen Low Rox qPCR Master Mix (Thermo Scientific, USA).

Предимствата на използваната в този кит боя SYBR Green са, че може да се използва за различни PCR реакции и е с висока чувствителност (много флуоресциращи молекули се закачват към продукта). Тя е флуоресцентна интеркалираща боя, която се свързва към двойноверижна ДНК и изпраща флуоресцентен сигнал при свързване. При qPCR с нарастването на количеството ДНК пропорционално се увеличава и флуоресцентният сигнал.

Китът съдържа следните реактиви: Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (2X), 40X Yellow Sample Buffer, вода свободна от нуклеази.

Master Mix включва Hot Start Taq ДНК полимераза, урацил-DNA гликозилаза (UDG) и dNTPs в оптимизиран PCR буфер. Той съдържа двойноверижна ДНК (двДНК) свързваща боя и се допълва със съответната пасивна ROX боя. Hot Start Taq ДНК полимераза е неактивна при стайна температура, като по този начин се избягва неспецифично удължаването на праймери или праймерни димери и се осигурява по-

висока специфичност на ДНК амплификацията. Uracil-DNA Гликозилаза (UDG) и dUTP са включени в микса за контрол на замърсяването.

Беше използвана контрола без кДНК. Като вътрешната контрола на реакцията беше използван  $\beta$ -актин.

- **Протокол:**

Всички реактиви бяха внимателно вортексирани преди употреба.

В стерилна епруветка беше подготвен разтворът за реакцията, който съдържа 15  $\mu$ l 2X Master Mix, по 0,9  $\mu$ l прави и обърнати праймери и чиста от нуклеази вода до 20  $\mu$ l. Реакционната смес беше добре миксирана и разпределена в три PCR епруветки (2 контролни и 1 за проба). Беше добавена 2  $\mu$ l кДНК към епруветката на пробата и контролата за  $\beta$ -актин, след което сместа беше нежно разбъркана.

PCR амплификацията беше проведена при следните условия: първоначална денатурация (първи сегмент) за 5 мин. на 95<sup>0</sup>С, втори сегмент: 30 сек. на 95<sup>0</sup>С, 30 сек. на 56<sup>0</sup>С и 50 сек. на 72<sup>0</sup>С за 40 цикъла, трети сегмент: 10 мин. на 72<sup>0</sup>С (за дореплициране на незавършени вериги), 30 сек. на 61<sup>0</sup>С и 30 сек. на 95<sup>0</sup>С за изготвяне на дисоциационна крива. Отчитането на количеството двойноверижна ДНК е зададено, както следва: в края на всеки цикъл във втори сегмент (за проследяване на амплификацията), на всеки градус при повишаването на температурата (от 60 до 95 °С) в трети сегмент (за изготвяне на крива на дисоциация и проследяване на специфичността на реакцията въз основа на денатурацията на получения продукт).

Установиха се еднопикови профили на дисоциационните криви за всяка двойка праймери, което доказва специфичността на протеклите амплификационни реакции. Праймерите използвани за амплификацията на Stat1 и  $\beta$ -актин бяха следните:

Stat1: СТАGТGGAGTGGAAAGCGGAG (прав)

САССАСАААСGAGCTCTGAA (обратен)

$\beta$ -actin: 50-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-30 (прав)

50-СТАGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-30 (обратен).

PCR продуктите бяха изследвани чрез електрофореза на 1.5% агарозен гел и бяха оцветени с етидиев бромид. Като ДНК маркер беше използван O'GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA).

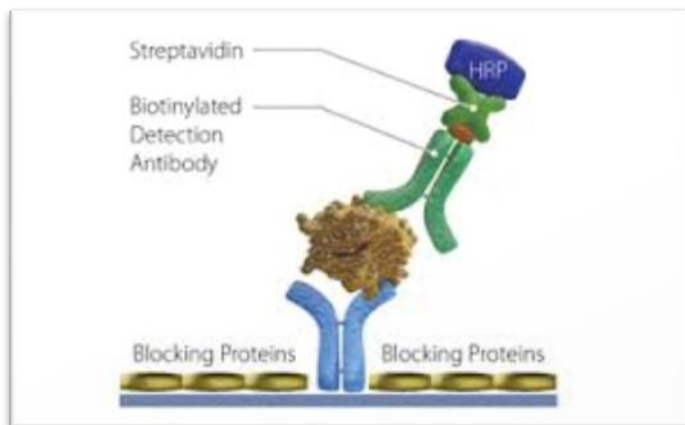
#### 4.8. Изследване цитокиновата секреция на ГБМ клетъчни култури чрез Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Наличието на секретирани цитокини беше изследвано при 60 часови кондиционирани среди от ГБМ, както и при съответстващите им контроли. За целта бяха използвани търговски китове, като за всеки кит бяха спазени инструкциите на производителя:

Human IL-4 (Arcus Biologicals, Italy), Human IL-6 ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human IL-8 ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human IL-10 ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human IL-12 ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human IL-17A ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human IL-18 ELISA Kit (MBL, Japan), Human IL-23 ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human TNF $\alpha$  ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human IFN $\gamma$  ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human TGF $\beta$ 1 ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human sPECAM ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human sICAM ELISA Kit (Gen-probe Diaclone SAS, France), Human MMP7 Kit (Abcam, UK) и Human MMP10 Kit (Abcam, UK).

ELISA е аналитично имунохимично изследване върху твърда фаза, което позволява установяването на специфична субстанция в течна проба, чието присъствие бива количествено или качествено определено. Методът се гради на антиген-антитяло реакция и е сред най-чувствителните за идентифициране и измерване на различни цитокини и други разтворими молекули. Използваните в настоящата дисертация китове са твърдофазови „сандвич“ ELISA за *in vitro* количествено определяне на цитокини в биологични материали. При този метод гнездата на съответната микротитърна плака са натоварени с високоспецифични антитела срещу търсения цитокин. След добавяне на изследваната проба се извършва свързване на разтворимия фактор към фиксираните върху гнездата на плаката антитела. След това се добавя биотинилирано антитяло, което също се свързва специфично с антигена. От тук идва името на метода „сандвич“ ELISA, тъй като търсеният антиген попада между двете специфични за него антитела. Към така получените комплекси се добавя конюгат (horse-radish peroxidase (HRP)-стрептавидин), който се свързва с биотина и осъществява ензимна реакция след добавяне на тетраметилбензидин (TMB)-субстрат с образуване на цветен продукт. Ензимната реакция се стопира с H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, след което се извършва спектрофотометрично отчитане. Интензитетът на цветния продукт е правопрпорционален на количеството

антиген в биологичната проба. Построява се стандартна крива според калибраторите на всеки кит и по нея се определя количеството на търсения фактор в тестваните проби. (Фиг. 3)



High Sensitivity ELISA Technology.  
eBioscience.

(<http://www.ebioscience.com/media/images/resources/knowledge-center/application/elisa/high-sensitivity-elisa-kits/high-sensitivity-elisa-protocol-1.jpg>)

Фиг. 3 Схематично представяне на принципа на метода „сандвич“ ELISA.

За фирма Gen-probe Diaclone SAS, France наличните в китовете реактиви са следните: Pre-Coated Plates (96 well microtitre strip plate), Biotinylated Detection Antibody, стандарт(и), контрола(и) (където са налични), Buffers (Standard Diluent, Biotinylated Antibody diluent, HRP Diluent, Wash Buffer (където са необходими)), Streptavidin-HRP, ТМВ и Stop reagent. Ще бъде разгледана общата процедура на метода за IL-6, предоставена от фирмата и след това ще бъдат споменати разликите за всеки от останалите, изброени по-горе китове.

Процедура на метода:

№	Стъпка от метода	Подробно описание
1.	Подготовка на стандартите и серумите	Използван беше Standard Diluent Buffer (10x, разрежда се с дестилирана вода), подходящ за изследване на супернатанта от клетъчни култури. Стандартът трябва да бъде разтворен с количеството Standard Diluent Buffer, отбелязано на доставеното шишенце, като дава концентрация 200pg/ml. Изготвени бяха падащи разреждания на стандарта, за да се получи концентрационна редица от 200 до 6,25pg/ml. Контролите също бяха разредени със Standard Diluent Buffer

	като необходимото количество и очакваната концентрация са отбелязани на шишето.
2. Добавяне на пробите, стандартите, контролата и нулата към плаката.	Добавени бяха по 100µl в повторение към предварително определеното гнездо на плаката. Започва се със стандартите (от най-големият към най-малкия), нулата и контролата. Следва накапване на пробите. Нулевата контрола или „blank” представлява поставяне на Standard Diluent Buffer, като се очаква измерената концентрация на търсеният цитокин в това гнездо, след края на реакцията, да е нула.
3. Добавяне на биотинилирано анти тяло	Добавят се навсякъде по 50µl биотинилирано анти тяло. Биотинилираното анти тяло беше разрежено непосредствено преди накапването му с приложения в кита biotinylated antibody diluent в зависимост от броя на използваните стрипове (таблица приложена в кита).
4. Инкубация	Плаката се покрива с капак и се инкубира на стайна температура (18 до 25°C) за 1 час
5. Миене	Отстранява се капакът и се аспирира течността от всяко гнездо. Накапва се по 300µl миещ разтвор (200x разреден предварително с дест. вода) и се аспирира отново. Стъпката с миещият разтвор се повтаря още два пъти.
6. Добавяне на Streptavidin-HRP	Добавя се по 100µl Streptavidin-HRP разтвор на цялата плака. Streptavidin-HRP се разрежда непосредствено преди употреба с HRP diluent според количеството използвани стрипове (таблица приложена в кита).
7. Инкубация	Плаката се покрива с капак и се инкубира на стайна температура за 30 мин.
8. Миене	Повтаря се стъпка 5.
9. Добавяне на TMB Substrate	Добавя се 100µl TMB Substrate към всички гнезда в плаката. (готов за употреба)
10. Инкубация	Плаката се покрива с капак, поставя се на тъмно и се инкубира на стайна температура за 12-15 мин. Избягва се директното излагане на светлина чрез покриване на плаката с алуминиево фолио.

11. Добавяне на H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :Stop Reagent	Към всички гнезда на плаката се добавя по 100µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :Stop Reagent. Веднага след това резултатът се отчита на спектрофотометът при дължина на вълната 450 nm и 620 nm (приема се дължина на вълната от 610 nm до 650 nm).
--	---

Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 6 стандарта и Blank. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива. Чувствителността на кита за IL-6 по данни на производителя е <2pg/ml.

При изследването за IL-8 изходната концентрация на стандарта беше 2000pg/ml и бяха получени падащи разреждания за 6 стандарта, както следва: 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5pg/ml. Чувствителността на кита за IL-8 по данни на производителя е <25pg/ml.

Китът за изследване на IL-10 съдържа 6 стандарта, но изходната концентрация беше 400pg/ml, като бяха получени следните падащи разреждания: 400pg/ml, 200pg/ml, 100pg/ml, 50pg/ml, 25pg/ml, 12,5pg/ml. Пробите първо бяха инкубирани само с първото антитяло, положено върху плаката за 1 час, след което плаката беше измита. След това беше добавено второто биотинилирано антитяло и отново плаката беше инкубирана за 1 час. Чувствителността на кита за IL-10 по данни на производителя е <5pg/ml.

При изследването на IL-12 p70 бяха заложили 6 стандарта с максимална концентрация 25pg/ml, като падащите разреждания бяха следните: 25pg/ml, 12,5pg/ml, 6,25pg/ml, 3,12pg/ml, 1,56pg/ml, 0,78 pg/ml. В кита липсваше контрола. Включен беше усилвател на реакцията (Amplifier), който се разрежда непосредствено преди добавянето му в съответствие с броя използвани стрипове (таблица налична в кита). Инкубацията на пробата и биотинилираното антитяло траеше 3 часа. След 20 мин. инкубация със Streptavidin-HRP плаката беше измиване и беше добавян 100µl Amplifier. Следваше инкубация за 15 мин. и миене. Добавя се отново Streptavidin-HRP за 20 мин., след което се добавя TMB за 10-20мин. Всички инкубации бяха провеждани на клатачка на ниски обороти. Чувствителността на кита за IL-12 по данни на производителя е <0,75pg/ml.

Китът за IL-17A съдържа стандарт с концентрация след възстановяването 100 pg/ml, като от него бяха направени 6 падащи разреждания – 100pg/ml, 50pg/ml, 25pg/ml, 12.5pg/ml, 6.25pg/ml и 3.125pg/ml. Контрола в кита няма. Пациентските проби се разреждат в отделни епруветки 1:2 (100 µl от пробата се разрежда в 100 µl от

разредения Standard Diluent Buffer). Първата инкубация беше само с накапаните проби и трае 2 часа. След измиване беше накапвано биотинитираното анти тяло и беше инкубирано 1 час. ТМВ субстратът беше инкубиран за 5-15 мин. Получената концентрация на пробите беше умножена по дилуентен фактор 2 поради първоначалното разреждане.

По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за детекция на IL-17 е  $< 2.3 \text{ pg/ml}$ .

За определяне на IL-23 бяха използвани 6 стандарта, като най високата концентрация беше  $5000 \text{ pg/ml}$  и в последствие бяха направени падащи разреждания, както следва:  $5000 \text{ pg/ml}$ ,  $2500 \text{ pg/ml}$ ,  $1250 \text{ pg/ml}$ ,  $625 \text{ pg/ml}$ ,  $312,5 \text{ pg/ml}$ ,  $156,2 \text{ pg/ml}$ . В кита липсва контрола. Инкубацията на пробите и биотинилираното анти тяло траеше 2 часа, а инкубацията с ТМВ – 10-20 мин. По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за детекция на IL-23 е  $< 20 \text{ pg/ml}$ .

При определяне на TNF $\alpha$  отново бяха налични 6 стандарта, както следва:  $800 \text{ pg/ml}$ ,  $400 \text{ pg/ml}$ ,  $200 \text{ pg/ml}$ ,  $100 \text{ pg/ml}$ ,  $50 \text{ pg/ml}$ ,  $25 \text{ pg/ml}$ . Налична беше контрола. Първата инкубация траеше 3 часа (проби и биотинилирано анти тяло). По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за детекция на TNF $\alpha$  е  $< 10 \text{ pg/ml}$ .

В кита за изследване на IFN $\gamma$  стандартите бяха следните:  $400 \text{ pg/ml}$ ,  $200 \text{ pg/ml}$ ,  $100 \text{ pg/ml}$ ,  $50 \text{ pg/ml}$ ,  $25 \text{ pg/ml}$ ,  $12,5 \text{ pg/ml}$ . Налична беше и контрола. Първата инкубация траеше 2 часа (проби и биотинилирано анти тяло). По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за детекция на IFN $\gamma$  е  $< 5 \text{ pg/ml}$ .

Кита за определяне на TGF $\beta$ 1 съдържаше: 20-пъти концентриран Assay Buffer Concentrate (вместо Standard Diluent Buffer), 1N HCl, 1N NaOH, стоп разтвор (1M фосфорична киселина), синьо, зелено и червено багрило. Налични бяха 6 стандарта с най-висока концентрация  $2000 \text{ pg/ml}$  и следните падащи разреждания:  $2000 \text{ pg/ml}$ ,  $1000 \text{ pg/ml}$ ,  $500 \text{ pg/ml}$ ,  $250 \text{ pg/ml}$ ,  $125 \text{ pg/ml}$ ,  $62,5 \text{ pg/ml}$ . Контрола липсваше. За улеснение при извършване на имуноензимния метод към кита използвахме оцветяване с приложените бои – 200  $\mu$ l синя боя към 50 ml буфер, предназначен за разреждане на пробите; 120  $\mu$ l зелена боя с 12 ml Assay Buffer, с който разредихме биотинилираното анти тяло и 48  $\mu$ l червена боя с 12 ml Assay Buffer, с който разредихме стрептавидина. Друга особеност на методиката беше предварителното третиране на пробите: всяка проба беше разредена 1:10 с Assay Buffer (180  $\mu$ l Assay Buffer + 20  $\mu$ l проба), след което към така разредените проби беше добавяна 1N HCl и пробите бяха инкубирани 1 час. Реакцията

беше стопирана чрез добавяне на 20µl 1N NaOH. Плаката беше измита трикратно с 300µl Wash разтвор преди нанасянето на пробите. Към измитата плака беше добавен по 60µl Assay Buffer, след което бяха добавени по 40µl от обработените проби. Следваха 2 часа инкубация. Всички инкубации бяха извършени на клатачка при 100об./мин. Плаката беше измита и беше добавено 100µl от биотинилираното анти тяло за 1 час. Инкубацията с добавеният след това Streptavidin-HRP беше 1 час, а със субстратния разтвор – 30 мин. Поради разреждането на пробите, полученият краен резултат беше умножен по 15. По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за детекция на TGFβ1 е <9 pg/ml.

При изследването на sPECAM/CD31 в кита бяха предоставени 6 стандарта (10 pg/ml, 5 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,25 pg/ml, 0,63 pg/ml, 0,31pg/ml) и контрола. Пробите бяха разредени 1:4 (50µl проба в 150µl Standard Diluent Buffer) и първата инкубация с биотинилираното анти тяло траеше 2 часа. Поради разреждането на пробите, полученият краен резултат беше умножен по 4. По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за детекция на TGFβ1 е <0,17 ng/ml.

В кита за изследване на sICAM/CD54 бяха предоставени 6 стандарта (8 pg/ml, 4 pg/ml, 2 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml, 0,25pg/ml) и контрола. Пробите бяха разредени 1:100 (10µl проба в 990µl Standard Diluent Buffer). Поради разреждането на пробите, полученият краен резултат беше умножен по 100. По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за детекция на TGFβ1 е <0,1 ng/ml.

Китове за IL-4, IL-18, MMP7 и MMP10 бяха на други производители, но тъй като общият принцип на извършването на „сандвич“ ELISA е същият, отново ще бъдат описани само разликите с вече описаната методика.

В кита за IL-4 беше предоставен стандарт, но липсваше контрола. Стандартът беше разреден до получаване на концентрация 500pg/ml, след което бяха правени падащи разреждания: 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 и 7,8pg/ml. Инкубацията след пипетирането на пробите и биотинилираното анти тяло траеше 2 часа. Миенето след всяка инкубация беше четирикратно. Инкубацията с TMB беше с продължителност 30 мин. При процедурата беше използван blank, които беше съставен само от накапването на хромогена и стоп разтвора (в това гнездо не се капе нито един от останалите реактиви). Резултатите бяха отчетени при дължина на вълната 450nm и задаване на blank. Беше построена крива според получените от стандартите резултати и стойностите на пробите бяха преизчислени по нея. По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за детекция на IL-4 е 2 pg/ml.

В предоставения ни за изследване на IL-18 кит бяха включени следните реактиви: Microwells, Human IL-18 calibrator, Conjugate reagent (Peroxidase conjugated anti-human IL-18 antibody(x101), Conjugate diluent, Assay diluent, Wash concentrate (x10), Substrate reagent (TMB) и Stop solution (0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Максималната получена концентрация след разреждане на калибратора беше 2,5ng/ml и от него бяха направени следните падащи разреждания: 1,25, 0,625, 0,312, 0,156 и 0,078pg/ml. Пробите бяха разредени 1:5 с Assay diluent (40µl +160µl). Пипетирани бяха по 100µl от пробите и стандартите върху плаката и бяха инкубирани за 1 час. Следваше миене и добавяне на 100µl конюгат (Peroxidase conjugated anti-human IL-18 antibody) за 1 час. След ново измиване следваше инкубация със субстрат за 30 мин. и стопиране на реакцията. Поради предварителното разреждане на пробите, резултатите бяха умножени по 5. По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за детекция на IL-18 е 12,5 pg/ml.

При изследването на MMP7 и MMP10 процедурата беше еднаква. За двата кита бяха заложи по 7 стандарта, които за MMP7 бяха в следните падащи разреждания: 100, 33,33, 11,11, 3,70, 1,23, 0,41 и 0,137pg/ml, а за MMP10 – 1500, 500, 166,7, 55,56, 18,52, 6,17 и 2,06pg/ml. Първата инкубация беше 2ч. и 30 мин. и беше извършена след нанасяне на пробите. След измиване на плаката беше добавено биотинилирано анти тяло, което беше инкубирано 1ч. Плаката престоля със Streptavidin-HRP 45мин. и след измиване – с TMB 30мин. За стопиране на реакцията беше добавен по 50µl стоп разтвор. Резултатът беше отчетен веднага при дължина на вълната 450nm и беше построена крива, според която получените от пробите резултати бяха преизчислени в pg/ml. Чувствителността на кита за MMP7 по данни на производителя е <0.15 ng/mL, а за MMP10 е <3pg/ml.

## **4.9. Изследване способността на активация на Т-лимфоцити, изолирани от здрави донори след култивирането им в среда от ГБМ клетъчни култури и стимулация с фитохемаглутинин**

### **4.9.1. Изолиране на РВМС**

Кръв от 8 здрави донори беше взета от обучени лаборанти в Лаборатория по клинична имунология УМБАЛ “Св. Иван Рилски”, чрез рутинна венепункция, според изискванията на добрата медицинска практика. Кръвта беше взета в специални епруветки, съдържащи фикола (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare), и беше разклатена

няколко пъти преди да бъде центрофугирана на 3300об./20мин. Изолирането на РВМСс беше извършвано в стерилен бокс, като надлежащата над фиколовия пръстен левкоцитна пелена беше събрана внимателно с пастьорка и беше поставена в 50 мл епруветка. След това клетките бяха промити с 40мл стерилен PBS, центрофугирани на 1400об./10мин. и надутайката беше отлята. Беше добавен 1мл PBS, след което преди култивиране клетките бяха преброени в камера на Bürker, както е описано в т. 4.4.

След адаптирането към клетките беше добавен 10ml PBS и те бяха разделени в две 15ml епруветки, след което бяха центрофугирани на 1400об./10мин. Към едната епруветка беше добавена 3ml DMEM съдържаща 10% FBS , EGF и FGF и служеше за контрола, а към другата 3ml супернатанта от ГБМ култура, отглеждана в същата среда. След това клетките бяха посетени в две отделни ямки в 6 ямкова плака и престояха така 60 часа в термостат на 37<sup>0</sup>С и 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.9.2. Стимулация на РВМСс с фитохемаглутинин.

РВМСс от контролната ямка и от тази съдържаща среди от ГБМ клетъчни култури бяха ресуспендирани, събрани в 15 мл епруветки и центрофугирани на 1200об./5мин. Супернатантите бяха отлети, разфасовани в епруветки и бяха замразени на -70<sup>0</sup>С в хладилник, за последващо изследване на IL-10.

Фитохемаглутинин (РНА, Sigma Aldrich, USA) беше предварително размразен. Към клетките беше добавен по 2 мл Cell Wash, като те бяха добре ресуспендирани и разделени по равно в по 2 флоуцитометрични епруветки – 1 контролна и 1 за РНА стимулация. Така за контролната проба бяха получени 2 епруветки (1 с нестимулирани клетки и 1 с клетки стимулирани с РНА). Подобно за РВМСс култивирани в среди от ГБМ култури се получиха също 2 епруветки (1 с нестимулирани клетки и 1 с клетки стимулирани с РНА). Към епруветките за РНА стимулация бяха накапани по 10µl РНА на 1 ml клетъчна суспензия, след което четирите епруветки бяха инкубирани 4 часа на 37<sup>0</sup>С. Клетките бяха внимателно вортексирани на всеки час.

След инкубацията от всяка епруветка бяха прехвърлени по 100 µl в нова флоуцитометрична епруветка, след което бяха добавени по 10µl CD69/PE (BD Pharmingen, USA) и 10µl CD3/FITC (BD Pharmingen, USA). Клетките бяха инкубирани 20 мин. на стайна температура на тъмно. След това РВМСс бяха промити с 2ml Cell Wash, центрофугирани на 1200об./5мин., отлети и вортексирани. Клетките бяха фиксирани с 500 µl фиксиращ разтвор (CellFix, Becton Dickinson, USA).

Отчитането на резултатите беше извършено на флоуцитометър FACS Calibur (BD), а за анализ на данните беше използвана програма CellQuest и WinMDI 2.2. Бяха събирани по 10 000 събития за всяка проба като след това беше отчетен процентът на клетките двойно-експресиращи CD3 и CD69 в сравнение с контролните клетки.

Беше изчислен индекс на стимулация (ИС) на маркираните по CD3 и CD69 активирани Т-лимфоцити по следната формула:

$$\text{ИС} = \frac{\% \text{ активирани от РНА Т-лимфоцити}}{\% \text{ спонтанно активирани Т-лимфоцити}}$$

#### 4.9.3. Статистически методи

Статистическият анализ на суровите данни беше извършен с програма Software package for statistical analysis (SPSS®), IBM 2009, версия 19 (2010) и Excel (v.2010). Използвахме непараметричен метод на Mann-Whitney. Графичните изображения, представящи статистическите данни, са изготвени основно с помощта на Excel и на SPSS v.19.

#### 4.9.4. Изследване на наличието на IL-10 в супернатанта от PBMC, изолирани от здрави донори след култивиране в среда от ГБМ клетъчни култури

Замразените на  $-70^{\circ}$  среди от PBMCs култивирани в контролни среди, както и в среди от клетъчни култури от ГБМ бяха размразени и тествани за секреция на IL-10, като се спазваха стриктно изискванията на фирмата производител. ELISA методът е описан в т.4.8.

#### 4.10. Изследване на маркери, характерни за мезенхимни стволови клетки при ГБМ клетъчни култури

Според изискванията на Международното дружество за клетъчна терапия (ISCT) дадена клетъчна популация може да бъде идентифицирана като „мезенхимна стволова”, ако се докаже експресията на следните повърхностни маркери CD90, CD73, CD105, CD29, както и липсата на експресия на CD45/CD34. За изследване на повърхностни маркери, характерни за МСК при клетъчни култури от ГБМ бяха използвани следните моноклонални антитела :

1. anti-CD29 PE (BD Pharmingen, USA)
2. anti-CD73 PE (BD Pharmingen, USA)
3. anti-CD90 FITC (BD Pharmingen, USA)
4. anti-CD105 PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen, USA)
5. anti-CD45 FITC/CD34 PE (BD Pharmingen, USA)

Беше следван протокол за повърхностно маркиране, описан в т. 4.5.1. Специфичното оцветяване беше отчетено с флоуцитометър FACSCalibur (BD). За анализ на данните беше използвана програма CellQuest и WinMDI 2.2. Бяха събирани по 10 000 събития за всяка проба, като след това беше отчетен процентът на клетките, експресиращи дадения маркер, а експресията се сравняваше с негативната контрола, представляваща немаркирани клетки. С цел допълнително фенотипизиране на маркери специфични за МСК бяха изследвани още CD146 и HLA-A,B,C – anti-human CD146 PE (BD Pharmingen, USA) и anti-human HLA-ABC FITC (BD Pharmingen, USA), като беше следван вече посоченият протокол за изследване на повърхностни клетъчни маркери, а резултатите бяха отчетени с флоуцитометър FACSCalibur (BD) и програми CellQuest и WinMDI 2.2.

#### **4.11. Изследване на способността за адипогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ**

За индуциране на адипогенна диференциация, достигналите над 80% конfluентност клетъчна култури от ГБМ на пасаж 2, бяха препосаяти в 24-ямкови плаки (SPL Life Sciences, Korea) в концентрация  $5 \times 10^4$  клетки/cm<sup>2</sup> и култивирани в клетъчна среда DMEM/F12 в присъствие на 10% FBS, dexamethasone (Sigma-Aldrich) 1 µM, bovine insulin (Sigma-Aldrich) 5 µg/ml, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) (Sigma-Aldrich) 0.25 mM, indomethacin (Sigma-Aldrich) 60 µM. Свежа адипогенна културелна среда беше добавяна на всеки 3 дни в продължение на 21 дни. Паралелно, контролни клетки бяха култивирани единствено в DMEM/F12 + 10% FCS. В края на стимулационния период, степента на адипогенна диференциация беше определена чрез оцветяване с Oil Red O. Първоначално клетките бяха промити с PBS, след което бяха фиксирани с 10% неутрален формалинов разтвор (Merck, Germany) в продължение на 30 мин. на стайна температура. Фиксираните клетки бяха промити еднократно с дестилирана вода и оцветени с прясно приготвен 0.6% разтвор на Oil red O (3 части 1% разтвор на Oil Red

О в изопропанол се смесват с 2 части дестилирана вода) за един час на стайна температура. Излишното багрило беше отстранено чрез промиване с дестилирана вода. Наличието на оцветяване беше наблюдавано под инвертен светлинен микроскоп (Leica, Germany).

#### **4.12.Изследване на способността за остеогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ**

За индуциране на остеогенна диференциация, достигналите над 80% конfluентност клетъчни култури от ГБМ на пасаж 2 бяха препосаяти в 24-ямкови плаки (SPL Life Sciences, Korea) в концентрация  $5 \times 10^4$  клетки/ $\text{cm}^2$  и култивирани в клетъчна среда DMEM/F12 в присъствие на 10% FBS, 100nM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 0,2 mM ascorbic acid-2-phosphate (Sigma-Aldrich) и 10mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma-Aldrich). Свежа остеогенна културална среда беше добавяна на всеки 3 дни в продължение на 21 дни. Паралелно, контролни клетки бяха култивирани единствено в DMEM/F12 + 10% FBS. В края на стимулационния период, степента на остеогенна диференциация беше определена чрез измерване на алкално-фосфатазна активност и чрез оцветяване по von Kossa. За установяване на алкално-фосфатазна активност третираните с остеогенни фактори клетки, както и недиференцираните контролни клетки бяха промити с PBS, след което във всяка експериментална ямка бяха добавени по 150  $\mu\text{l}$  алкално-фосфатазен буфер (0,05 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH = 9,5), съдържащ 0,1% (v/v) Triton X-100 (Merck, Germany). Плаката беше замразена на  $-80^\circ\text{C}$  (5 мин.) и веднага след това размразена. Тази процедура беше извършена три пъти. В ямките (24-ямкова плака; 2  $\text{cm}^2$ , SPL Life Sciences, Korea) с вече лизирани клетки бяха прибавени по 150  $\mu\text{l}$  от разтвора на алкално-фосфатазния субстрат 4-p-nitrophenylphosphate (3.5 mM в алкално-фосфатазен буфер) и получената цветна реакция беше отчетена спектрофотометрично на micro-ELISA reader (Dynatech AG, USA) при дължина на вълната 405 nm.

Оцветяване по von Kossa се осъществи като остеогенно диференцираните, както и контролните клетки бяха промити еднократно с PBS, след което бяха третирани с 1% (w/v) разтвор на сребърен нитрат ( $\text{AgNO}_3$ ; Sigma-Aldrich, USA) при облъчване с ултравиолетова светлина ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ; трансилюминатор Camag Reprostar 3, Switzerland) в продължение на 60 мин. При интензивно UV облъчване на калциев карбонат или

калциев фосфат в присъствие на  $\text{AgNO}_3$ , сребърните катиони се свързват с карбонатните/фосфатните аниони, при което формиралите се соли ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  или  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ) се оцветяват в черно. За отстраняване на остатъчното количество  $\text{AgNO}_3$ , клетките бяха промити с PBS. Наличието на  $\text{Ca}^{2+}$  минерални отлагания с характерно черно оцветяване беше детектирано на инвертен светлинен микроскоп (Leica, Germany)

## **4.13. Изследване експресията на progesterone induced blocking factor (PIBF) при ГБМ клетъчни култури**

### **4.13.1. Флоуцитометрично изследване**

При повечето злокачествени клетки PIBF е вътреклетъчен маркер, поради което клетките от ГБМ клетъчни култури бяха маркирани и отчетени по начина описан в т. 4.5.1. Към клетките беше добавено 1мл моноклонално антитяло anti-PIBF 3A6 (моноклонално антитяло, получено и характеризирано от членове на нашия екип (*Ivanova-Todorova et al., 2008*)) и инкубацията с него траеше 2 часа. В контролните клетки беше добавяно същото количество Cell Wash разтвор.

След промиване със CellWash беше добавено 10  $\mu\text{l}$  второ анти-мише антитяло IgG FITC (eBioscience, USA) за 30 мин. Маркирането с второ антитяло беше последвано от измиване, фиксиране и отчитане на резултатите по описания вече начин. За достоверност на резултатите бяха използвани две контроли – една автофлуоресцентна контрола, съдържаща само клетки и една само с клетки, маркирани с IgG FITC.

### **4.13.2. Флуоресцентна конфокална микроскопия**

Флуоресцентната конфокалната микроскопия беше извършена по начина описан в т. 4.5.2., като бяха използвани: мише анти-човешко моноклонално антитяло 3A6 anti-PIBF и второ анти-мише Alexa Fluor 488 (1:1000, Invitrogen, USA). Флуоресцентните проби бяха анализирани чрез конфокален лазерен сканиращ микроскоп (Leica TCS SPE, Germany).

### **4.13.3. q RT-PCR метод**

qRT-PCR метода беше извършен, както е описано в т.4.7. Използвани бяха следните праймери:

PIBF, 50-GTCAGCTTTACTACAGACGA-30 (прав)

50-CTCTTTAGGCACATTCAAAGTC-30 (обратен)

## 5. Резултати и обсъждане

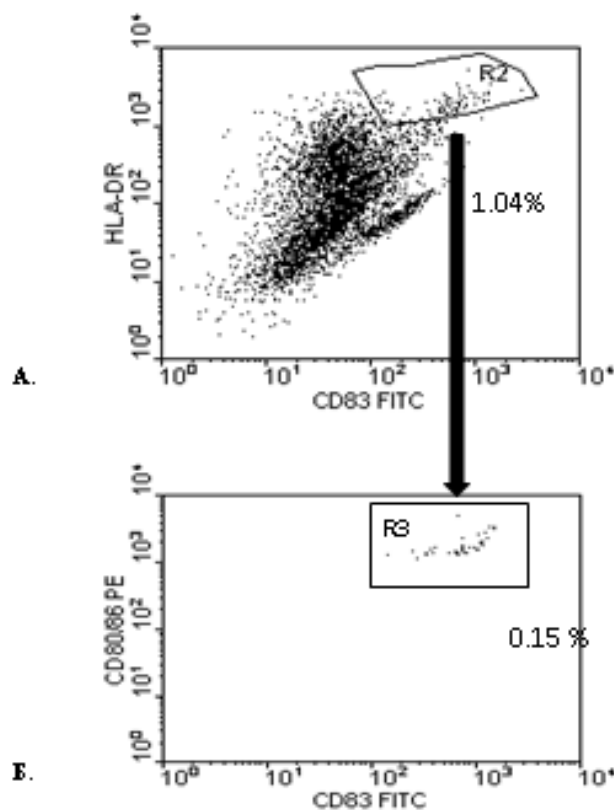
### 5.1. Имуфенотипизиране на имунни клетки, инфилтриращи ГБМ

#### 5.1.1. Антиген представящи клетки, инфилтриращи ГБМ

АПК стоят в началото на всяка специфична имунна реакция и промяната на функциите им обикновено води до толеранс от страна на ИС. Злокачествените образувания много често използват свойствата на тези клетки, за да избегнат ефективна имунна реакция. В мозъка има няколко вида клетки, за които се смята, че могат да представят антигени – ДК, периваскуларни клетки, макрофаг/микроглия и астроцити. (Aloisi *et al.* 2000; Dimov *et al.* 2010) Изследванията в литературата за ролята на АПК в микросредата на ГБМ, сочат, че тези клетки не експресират костимулаторни молекули, което води до предизвикване на толерогенен имуен отговор, поради липсата на ко-стимулация на Т-клетките, водеща до тяхното състояние на анергия.

Въз основа на данните от научната литература, чрез флоуцитометричен анализ беше проведено изследване за установяване на АПК и на експресираните от тях ко-стимулаторни молекули в хомогенизиран материал от ГБМ. АПК бяха отчетени по експресията на маркерите CD83 и HLA-DR (Фиг.4), които са характерни за зрели ДК, но в ЦНС се експресират и от макрофаг/микроглията. Беше установено наличие на АПК в изследваните ГБМ, като в централната зона количеството им беше по-голямо – средно 0.3% (от всички отчетени клетки), в сравнение с периферната – 0,09%. На Фиг. 4 А. са представени клетките от туморната клетъчна маса, след тяхната обработка, като в област R2 са „хванати“ двойно-положителните за CD83 и HLA-DR клетки. Процентът клетки, експресиращи ко-стимулаторния комплекс В7 (CD80, CD86) от АПК в R2 областта, беше определен като те бяха представени на друг плот и „хванати“ в област R3 (Фиг.4 Б). Беше установено, че само средно 0,02% от АПК, установени в централната част на тумора, експресират ко-стимулаторния комплекс, като този процент за АПК в периферната част беше само 0,01%.

На фигура Фиг. 4 е показана представителна графика от описаните експерименти. Липсата на В7 предполага, че АПК са не само неспособни да активират ефективен имуен отговор, а дори обратно те явно са клетки индуциращи имуен толеранс.



Фиг. 4 Флоуцитометрична платформа за определяне на АПК, инфилтриращи ГБМ.

А. Плот, в който са представени клетките от цялата туморна маса. В област R2 са „хванати“ двойно-положителните за HLA-DR и CD83 АПК. Б. В R3 са представени клетките положителни за комплексът CD80/CD86.

При изследването на клетки, инфилтриращи ГБМ, за установяване на наличие на зрели дендритни клетки нашият екип използва маркерите CD83 и HLA-DR. Те са характерни за този тип клетки и се използват широко при фенотипизирането им. Както стана дума обаче, в ЦНС съществуват други типове клетки, които имат антиген представящи свойства и които също експресират на повърхността си тези маркери. CD83 например се експресира освен от ДК и от периваскуларни АПК, макрофаг/микроглия и дори от неврони. (*Ifergan et al., 2007; Glezer et al., 2015*) HLA-DR се експресира нормално от макрофаг/микроглията в ЦНС, от астроцити *in vitro* след стимулация с IFN $\gamma$ , а при определени обстоятелства и от периваскуларни клетки. (*Ulvestad et al., 1994*) Тези факти не ни дават възможност да идентифицираме категорично установените от нас двойно положителни за CD83 и HLA-DR клетки, инфилтриращи изследваната туморна маса, като дендритни клетки. Ето защо нашият екип прие да нарича тези клетки с

общото име антиген представящи (АПК). Въпреки, че използваните от нас маркери не ни дават категорична увереност, за да опишем изследваните клетки като дендритни, съществуват данни, доказващи наличието на техните предшественици – CD14+ моноцитите, като клетки инфилтриращи туморната маса. (*Gustafson et al. 2010*) Резултатите на *Hussain et al. 2006* са в синхрон с нашите данни, относно наличието на АПК в микросредата на ГБМ и липсата на експресия на ко-стимулаторни молекули. Авторите описват наличие на микроглия (средно 0,37% от цялата изследвана туморна маса) по маркери CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> и на ДК (средно 0.08%) по маркери CD1c<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>BDCA-2<sup>-</sup> и CD1c<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>BDCA-2<sup>+</sup>. Подобно на нашите резултати те отчитат, че процентът клетки експресиращи костимулаторни молекули от ГБМ инфилтриращата микроглия е много нисък (1-2%).

Както беше споменато малигнените образувания като ГБМ много често използват функциите на АПК, за да избегнат ефективен имунен отговор и за да променят реализирания такъв към толерогенен. (*Van Duivenvoorde et al. 2006*) АПК са способни да предотвратят, инхибират и модулират Т-клетъчния ефекторен имунен отговор, използвайки различни механизми. Един от механизмите, използван от туморите за постигане на тази цел е потискането на експресията на костимулаторни молекули като В7 комплекса. Липсата на тези молекули при контакта между АПК и ефекторните Т-лимфоцити води до изпадане на вторите в състояние наречено анергия, което, от своя страна, води до липса на ефективна имунна реакция и до толеранс от страна на имунната система към представяните от АПК антигени. (*Abe and Macian 2013*) От друга страна е установено, че намаленият брой или липсата на ко-стимулаторни молекули при дендритни клетки води до формиране на Т-регулаторни клетки при контакт с Т-лимфоцитите (*Maldonado and Andrian, 2010*) Следователно АПК локализирани в микросредата на ГБМ и не-експресиращи В7 молекули могат да допринесат за поддържане на толерогенен имунен отговор.

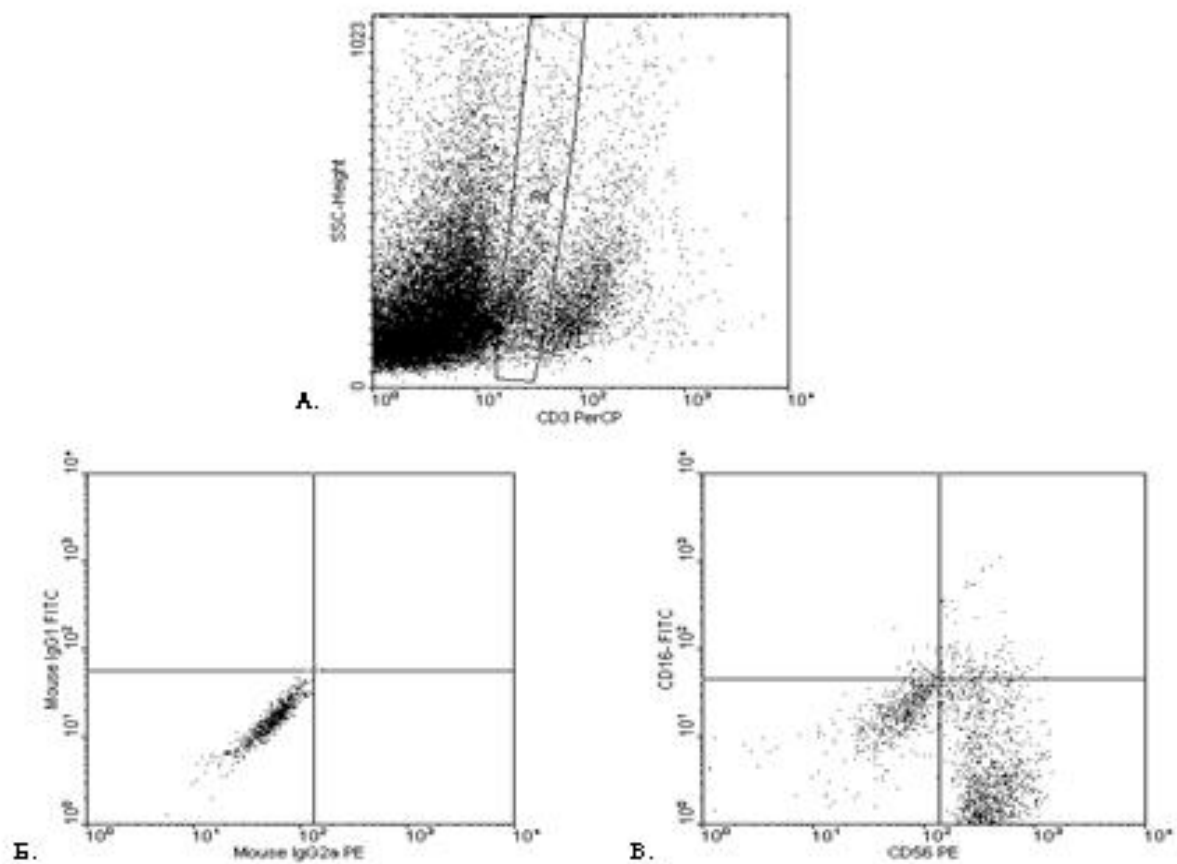
Получените резултати не ни дават възможност да отговорим на въпроса кой фактор от туморното обкръжение при ГБМ е отговорен за наличието на толерогенни АПК.

ГБМ насочва ДК в толерогенна посока чрез свои антигени, повърхностни рецептори и секреторни фактори. (*Van Duivenvoorde et al. 2006*) Най-значимите цитокини, поддържащи ДК в незрял, толероген фенотип, са IL-10 и TGFβ. IL-10 секретирани от туморните клетки може директно да действа върху ДК, супресирайки продукцията им на TNFα и IFNγ и насочвайки клетките към толерогенен фенотип, характеризиращ се с липса на В7 експресия. TGF-β секретирани от туморните клетки, от своя страна, води до

намаляване на експресията на МНС клас II и ко-стимулаторни молекули от ДК. (*Wallet et al. 2005; De Souza and Bonorino 2009.*) Друг цитокин, участващ в тези процеси е IL-6, чиято секреция е установена от ТСК и от тумор инфилтриращите клетки при ГБМ. IL-6 инхибира диференциацията на ДК, което води до трансформирането им в толерогенни ДК. Tregs налични в туморната маса също могат да доведат до поява на толерогенни ДК. Те индуцират имунен толеранс, както чрез пряк контакт, така и чрез цитокини, инхибирайки съзряването на ДК и способността им да представят антигени. (*Sakaguchi et al. 2004; Jiang et al. 2006*)

### **5.1.2. Изследване на NK и Т клетки, инфилтриращи ГБМ**

NK клетките са основната клетъчна популация в организма с антитуморно действие. Ролята им е да разпознават клетки чрез сигнал „липса на свое“, изразяващо се в променената експресия на HLA молекули. Много често, за да избегнат действието на цитотоксичните Т-лимфоцити, вирус инфектираните и туморните клетки намаляват експресията си на HLA молекули. (*Wu et al. 2007*) Наличието на NK-клетки в централна и периферна зона на ГБМ беше изследвано чрез положителната експресията на маркерите CD16 и CD56 и отрицателната експресия на CD3. От всички аквизирани клетки в област R1 бяха „хванати“ негативните за CD3 клетки (Фиг. 5 А), като след това в нов плот бяха отчетени само двойно-позитивните за CD16 и CD56 (Фиг. 5 Б, В). Средните стойности за количеството на NK-клетки в централната част на ГБМ бяха 4,05% от всички аквизирани клетки, а за периферната част – 1,05%. Отново беше наблюдавано по-голямо количество имунокомпетентни клетки в централната област на тумора в сравнение с периферната. На Фиг. 5 Б. са представени контролни клетки, маркирани с антитяло от същия изотип, но без специфичност за CD16 и CD56 (изотипна контрола), а на Фиг. 5 В – специфичното оцветяване на установените двойноположителни по тези маркери клетки.

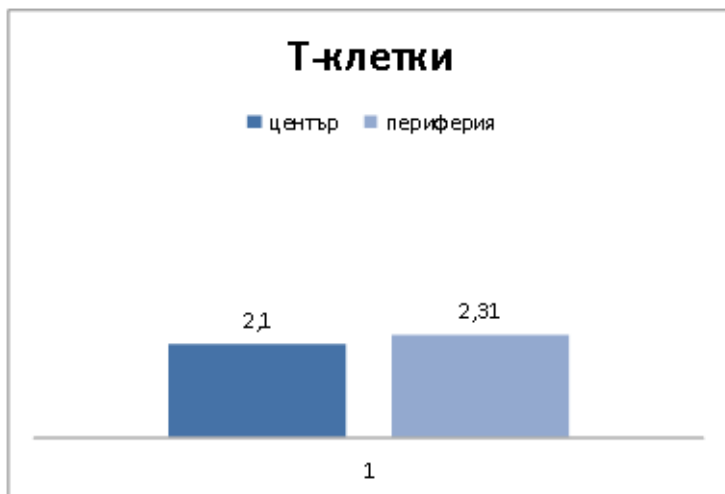


Фиг. 5 Флуоцитометрична платформа за определяне на НК-клетки инфилтриращи ГБМ. А. В прозореца са представени клетките от цялата туморна маса, като в R1 са „хванати“ клетките негативни за CD3. В прозорци Б. и В. са представени клетките, хванати в R1: Б. Изотипна контрола. В. В горния десен квадрат представя клетките двойноположителни за CD16 и CD56.

Други автори при изследване на инфилтрацията на глиобластоми с НК-клетки посочват подобни на нашите резултати – *Levy et al. 2011* съобщават, че НК-клетките представляват 2,11% от всички инфилтриращи ГБМ имунни клетки. Нашите резултати описват само наличието на НК клетки инфилтриращи ГБМ, но не дават информация за функционалното им състояние. Според литературните данни НК клетките експресират широк набор от активиращи рецептори (например DNAM-1 и NKG2D), като лигандите за някои от тях се експресират от туморните клетки. Въпреки наличието на НК клетки в туморната микросреда, те са неспособни да осъществят ефективен имунен отговор срещу ГБМ. Какви са причините за явната супресия на тези клетки все още е въпрос на дискусия между различни автори и обект на нови изследвания. Някои например смятат,

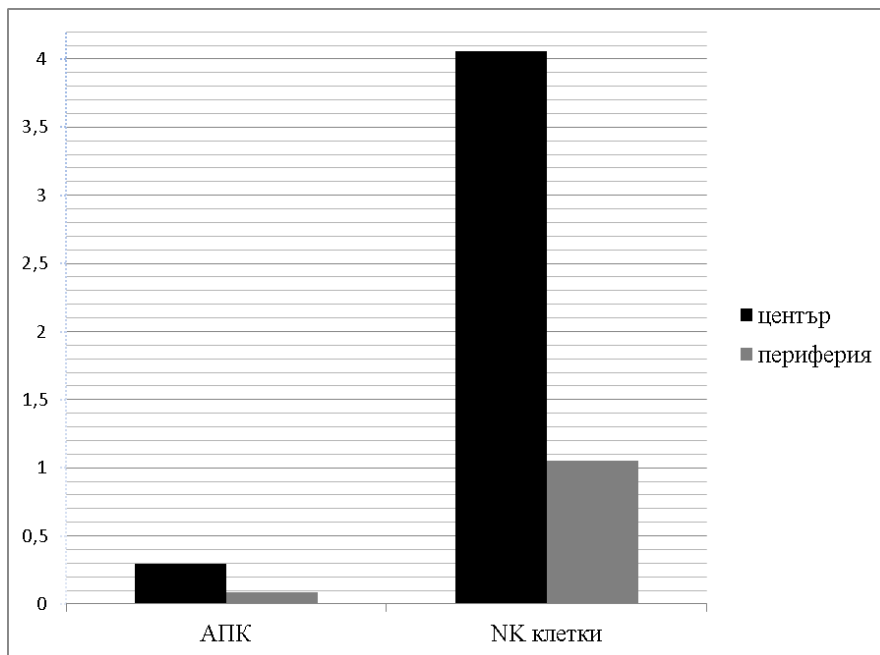
че липсата на класически HLA клас I молекули при клетките на ГБМ се компенсира от експресията на HLA-E и HLA-G, които се свързват с инхибиторни рецептори на повърхността NK клетките. (*Mittelbronn et al. 2007*) Други автори откриват експресия на класически HLA-A,B,C от туморните клетки. (*Purdy and Campbell, 2009; Castriconi et al.*) Най-нови изследвания сочат, също че ДК и NK-клетките активно си взаимодействат, като се счита, че зрелите ДК могат да активират NK-клетките. (*Degli-Esposti M. and Smyth M. 2005*) Поддържането на АПК в туморната микросреда в незрял, толерогенен фенотип би могло да допринесе за невъзможността на NK-клетките да се активират. В туморното обкръжение е установена и популация от MDSCs, която активно се привлича от ГБМ и за която се счита, че може ефективно да потисне NK-клетъчната активация. Това се случва при директен контакт между клетките (MDSCs и NK), при което се инхибира IL-2-медираната активация на NK-клетките и продукцията на перфорины. (*Liu et al. 2007, Rodrigues et al. 2010, Wu et al. 2010*).

При изследването на Т-лимфоцити беше установено наличие на CD3 положителни клетки (Т-клетки) в централна и периферна зона на ГБМ, но не беше установена значителна разлика в процента на клетките в двете зони – около 2% (Фиг. 6). Наличието на Т-лимфоцити установени от нас е в потвърждение на данните на *Hussain et al. 2006*, които при изследване за наличието на Т-клетки в туморната маса описват CD4<sup>+</sup> Т-клетки, които са средно 0.088% от цялата туморна маса и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, които са 0.043%. Отново установените от нас резултати не дават основание за изводи относно състоянието на инфилтриращите ГБМ Т-лимфоцити. Според литературните данни, под влияние на тумора се привличат и/или модифицират Tregs, които са в увеличен процент не само локално, но и в периферната кръв. (*Gustafson et al. 2010*) Наличието на антиген-представящи клетки с липсващ ко-стимулаторен комплекс, също би могло да се интерпретира като индиректна информация за анергичното състояние на Т-клетките, инфилтриращи ГБМ.

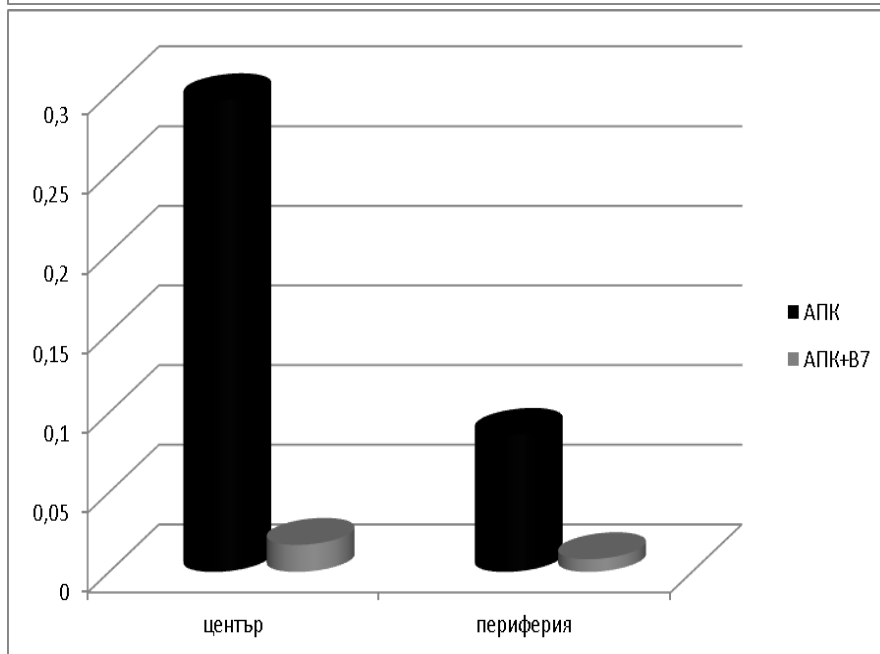


Фиг. 6 Разпределение на Т-лимфоцити в периферина и централна зони от ГБМ, изразено в проценти от общата туморна маса.

От получените резултати, при изследването на инфилтацията на ГБМ от клетки на имунната система, може да се заключи, че в централната зона на тумора се наблюдава по-голямо количество имунни клетки в сравнение с периферната (АПК и НК-клетки) и че повечето от АПК и в двете зони не експресират костимулаторния комплекс В7. (Фиг.7) Разликата в данните за инфилтрация на имунни клетки, получени при изследването на двете области от тумора може да бъде обяснена с фактът, че централната област се определя като „жизнен регион, който поема контрастна материя, не се характеризира с клетъчен разпад и некроза и е свързан с нарастване и инвазия на тумора към подлежащата „здрава“ мозъчна тъкан” (Piccirillo et al. 2012). Това означава, че именно това е мястото, където се извършва активната „борба“ между ИС и ГБМ и е напълно логично там да бъде съсредоточено по-голямо количество имунни клетки.



А.



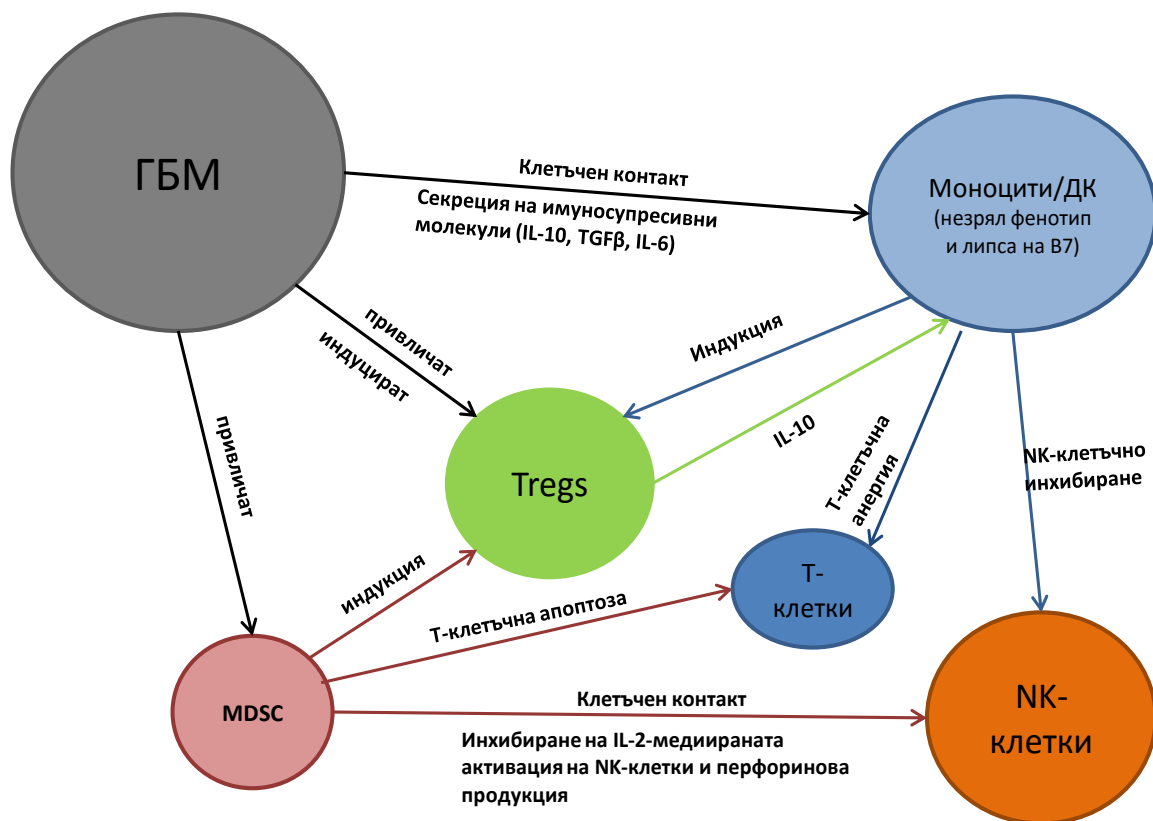
Б.

Фиг. 7 Съотношение между разпределението на изследваните имунни клетки в централна и периферна зони на ГБМ.

А. Разпределение на АПК и NK клетки в център и периферия на ГБМ. Б. Диаграмата отразява общия брой АПК в център и периферия на ГБМ (в черно) и процента АПК експресиращи ко-стимулаторния комплекс В7 (в сиво).

На база изложеното до тук, би могло да се спекулира, че имунният отговор в туморната маса на ГБМ съществува, но най-вероятно той е неефективен поради различни супресивни механизми използвани от тумора. Резултатите от нашите изследвания потвърждават един от вече известните механизми за потискане на ефективния отговор от страна на имунната система, а именно липсата на ко-стимулаторен сигнал,

експресиран от АПК, което по правило води до възникване на анергия при инфилтриращите тумора Т-лимфоцити или до трансформацията им към Tregs. За потвърждение на това предположение, обаче е необходимо да се извършат допълнителни изследвания.



Фиг. 8 Взаимоотношения между ГБМ и различни популации имунокомпетентни клетки, инфилтриращи туморната микросреда (на база наши резултати и литературни данни).

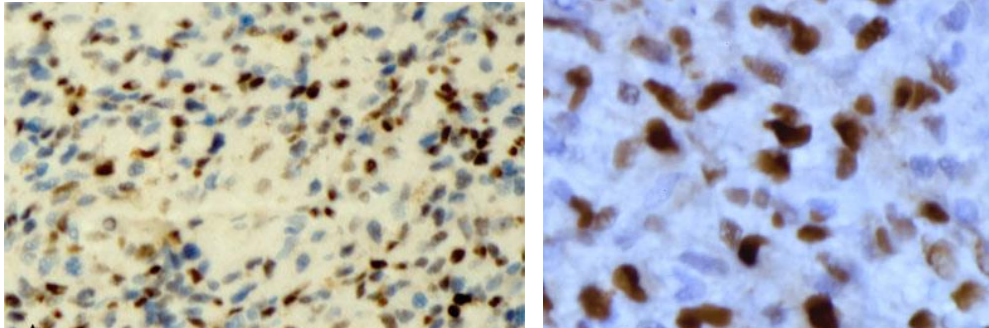
Туморът привлича и индуцира имunosупресивни клетъчни популации като Tregs и MDSCs и определя незрял фенотип и липса на B7 в антиген представящите клетки (моноцити/дендритни клетки). На свой ред тези клетки предизвикват супресия и/или апоптоза в ефекторните Т- и НК-клетки. ГБМ, а също MDSC и незрелите моноцити предизвикват диференциация на Т-лимфоцитите до Tregs.

## 5.2. Експресия на Stat3 от ГБМ

Наред с ролята на инфилтриращите имунокомпетентни клетки, които обуславят, както наличието на имунен отговор срещу тумора, така и индукция на толеранс в патогенезата на ГБМ значение имат и фактори, свързани с туморната прогресия и оцеляване. Типичен пример за такъв е транскрипционния фактор Stat3, чиято роля при злокачествените процеси е отдавна установена. Този фактор изглежда има важна роля при извършването на редица процеси в клетките, като модулира транскрипцията на множество гени, участващи в регулацията на клетъчната диференциация, пролиферация, апоптоза, ангиогенеза, метастазирание и имунен отговор. (*Johnston and Grandis 2011*) При нормални условия силата и продължителността на рецептор-индуцираната Stat3 активация са строго регулирани от множество ендеогенни протеинови регулатори, като някои протеин тирозин фосфатази (SHP-2, PTP1B, PTP $\epsilon$ C, TC45, SHP-1). (*Heinrich et al. 1998; Leeman et al. 2006*) Множество изследвания показват, че той има централна роля в развитието, прогресията и поддържането на множество човешки малигнени заболявания, като са установени повишени нива на постоянно активиран Stat3. Все още не е установена мутация, която предизвиква постоянната активация на този фактор, но са установени множество молекули, които могат да го активират. (*Leeman et al. 2006*) Такива са множество растежни фактори като EGF, TGF $\alpha$ , PDGF и CSF1 и цитокини като IL-6, LIF, CT-1, CNTF, IL-10, IL-11, които действат чрез EGFR, IL-6 цитокиновите рецептори и G protein-coupled receptors (GPCRs). (*Johnston and Grandis 2011*) Повишени нива на Stat3 активиращи лиганди като TGF $\alpha$  и IL-6 са установени в серум и в туморното обкръжение на пациенти при много малигнени заболявания. Повишеното ниво на транскрипционния фактор може да се дължи на автокринното, паракринното или ендокринното им действие. (*Leeman et al. 2006; Quesnelle et al. 2007; Frank 2007*)

Наличието на Stat3 беше установено върху срезове от хистологичен материал от ГБМ чрез имунохистохимия (ИХХ). В клетки от изследваните глиобластоми Stat3 беше търсен в активно състояние (тирозин фосфорилиран при Y705 – pY705-Stat3), което отговаря на неговия профил, описан в световната литература, а именно на транскрипционен фактор с онкогенетичен потенциал, който участва в клетъчния растеж и пролиферация. Беше установено, че 76,6% от изследваните глиобластоми експресират този фактор. В някои кръвоносни съдове на тумора бяха установени също и ендотелни

клетки положителни за pY705-Stat3. Случаите със силна (над 5% от всички туморни клетки) и много силна (над 20%) експресия на активиран Stat3 бяха 58,8% от изследваните материали. (Фиг. 9 А. и Б.)



А.

Б.

Фиг. 9 Положителна (силна) експресия на Stat3 ,установена чрез ИХХ изследване, проведено върху хистологични срезове от ГБМ. А. Снимката е направена на увеличение 20х; Б. Снимката е направена при увеличение 40х.

Наред с това беше установена обратно-пропорционална връзка на експресията на този фактор с преживяемостта на пациентите, т. е. колкото по-силна е експресията на Stat3, толкова по-кратка е преживяемостта на пациентите. (*Birner et al. 2010*)

Резултатите от изследването на Stat3 недвусмислено сочат неговата туморогенна роля при ГБМ. Установено е, че фосфорилирането на този фактор при тирозин 705 води до неговата димеризация, ядрена транслокация, свързване с ДНК и гена транскрипция. (*Aggarwal et al. 2011*)

Изследвания върху активността на Stat3 сочат, че той участва и при възпалителните процеси. Установено е, че този белтък е част от остро-фазовият отговор при възпаление, а също, че повечето от провъзпалителните фактори водят до активацията му. IL-6 е един от основните медиатори на възпалението и осъществява действието си чрез активация на Stat3 пътя. (*Zhong et al. 1994; Pfitzner et al. 2004*) Все повече изследвания сочат, че има връзка между възпалителните процеси, отключващи активацията на този фактор и началото на туморогенезата при различни малигнени заболявания. (*Bromberg and Wang 2009; Aggarwal et al. 2011*) И дори повече – прави се връзка между активацията на Stat3 от онкогени, протеин-тирозин кинази и вируси и трансформацията на различни клетки в туморни. (*Frank 2007*) При ГБМ все още липсват убедителни данни за връзка между възпалителни процеси и началото на този тумор. Въпреки това отделни автори описват наличие на вирусни протеини в клетки,

изолирани от ГБМ. (*Del Valle et al. 2002*) Моето лично мнение е, че изследванията в посока възпалителен отговор в ЦНС и неговите причинители, би трябвало да се задълбочат, за да се изясни въпроса има ли такъв тип имунен отговор връзка с възникването на злокачествени тумори.

Друг представител на семейството на Stat молекулите е Stat1, чиято експресия се свързва с относително по-благоприятно протичане на заболяването. Нашите резултати не показаха експресия на този протеин при имунохистохимичното му изследване (резултатите не са показани).

### **5.3. Резултати получени при клетъчно култивиране на клетки, изолирани от ГБМ**

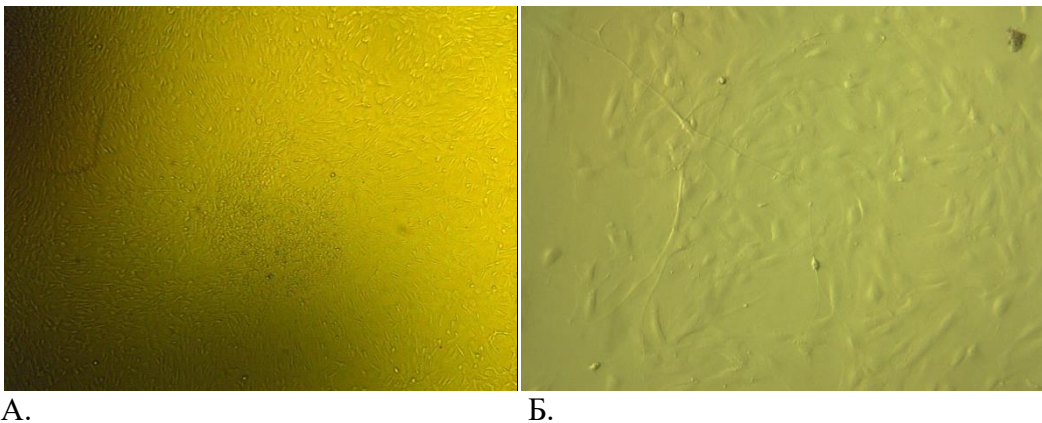
Клетъчното култивиране е метод, който позволява да се работи *in vitro* с клетки, близки по своите характеристики до *in vivo* съществуващите. Все пак винаги следва да се има предвид, че клетъчните култури не са пълен еквивалент на условията *in vivo*. Както беше споменато, при изучаването на ГБМ чрез клетъчно култивиране, преобладава мнението, че клетките, отглеждани в безсерумна среда с факторите EGF и bFGF и растящи под формата на невросфери (НС) се доближават повече до същността на формиращите тумора ТСК, докато тези култивирани в среда с FBS и формиращи адхерентни клетки (АК) са по-диференцирани. (*Kelly et al. 2009*) Тъй като специфичните условия в стволото-клетъчните ниши в организма, освен наличие на фактори, включват и наличие на серум, нашият екип разработи „междинен модел” на клетъчно култивиране на клетки, изолирани от ГБМ. При този модел клетките бяха поставяни в среда с фактори EGF, bFGF и FBS и подходът беше изпробван при 16 глиобластомни клетъчни култури. Наред с това, клетки изолирани от ГБМ бяха култивирани и по двата класически модела, като успешно бяха получени, както АК, така и НС. Класическият модел за получаване на адхерентни клетки беше приложен при 4 от получените ГБМ материала, а този за получаване на невросфери, беше приложен при 12 от туморите.

Клетките от първите 4 получени материала за култивиране, бяха изолирани от център и периферия на ГБМ, като клетъчни култури бяха успешно култивирани и от двете туморни области. Тъй като беше установено, че клетките, изолирани от централната туморна зона растат по-добре при култивиране и като вземем предвид данните за по-

интензивен имунен отговор в тази зона, останалите материали бяха изолирани само от тази област. Това наблюдение е в съответствие с описанието в литературата на централната зона, като „жизнен регион, който поема контрастна материя, не се характеризира с клетъчен разпад и некроза и е свързан с нарастване и инвазия на тумора към подлежащата „здрава” мозъчна тъкан”( *Piccirillo et al. 2012*). Данните, които са представени по-долу са за клетъчни култури, култивирани от клетки от централната зона на ГБМ.

### 5.3.1. Култивиране на клетки, изолирани от ГБМ за получаване на адхерентни клетки

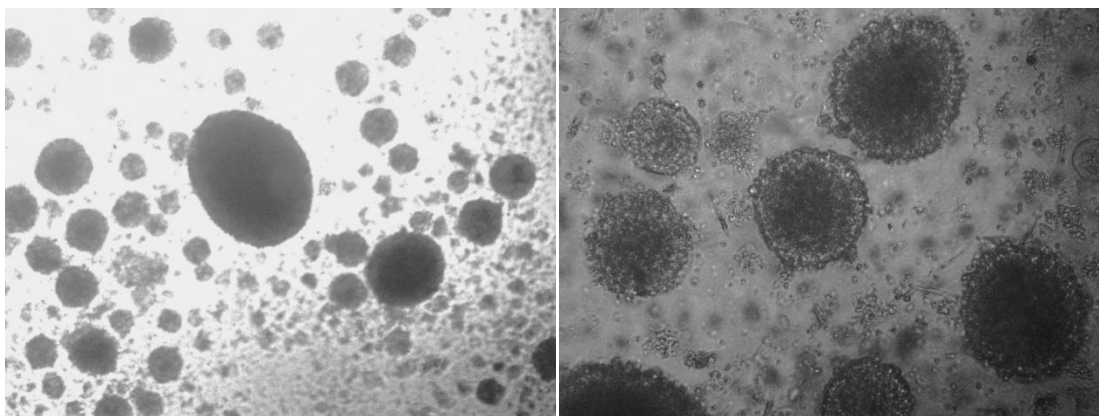
Всъответствие с данните описани в литературата, клетките, култивирани в среда с 10% FBS, растяха като фибробластоподобни клетки, прилепнали към дъното на плаката и формиращи монослой. (Фиг. 10) Не беше наблюдавана разлика в растежа и морфологията на клетки, изолирани от различните области на тумора.



Фиг. 10 Адхерентен растеж при култивиране на клетки, изолирани от централна и периферна област на ГБМ: А. Клетъчна култура от клетки, изолирани от централната област на ГБМ (увеличение 10x); Б. Клетъчна култура от клетки, изолирани от периферната област на ГБМ. (увеличение 20x)

### 5.3.2. Култивиране на клетки, изолирани от ГБМ за получаване на невросфери

Клетки от описаната като активна област на ГБМ бяха изолирани и култивирани при условия, които в литературните данни се посочва, че способстват формирането на НС-безсерумна среда с фактори EGF и bFGF. В съгласие с литературата и в нашите експерименти отглежданите по този начин клетки формираха плувачи НС. (Фиг. 11)

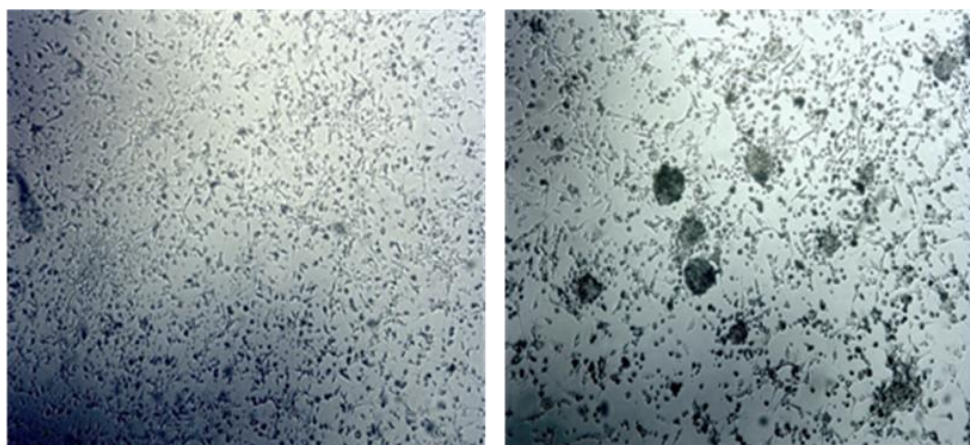


Фиг. 11 НС, формирани от клетки, изолирани от ГБМ, при култивиране с EGF и bFGF и без наличие на серум в средата.

### 5.3.3. Култивиране на клетки, изолирани от ГБМ за получаване на наш „междинен” модел

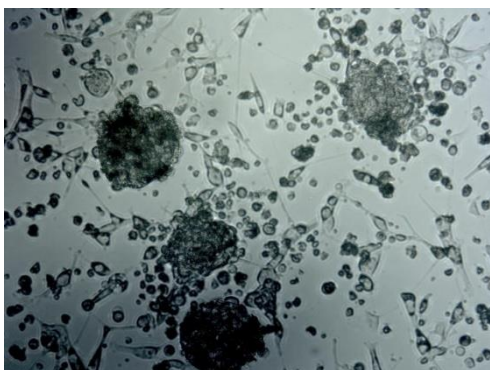
Клетките от ГБМ, които бяха отглеждани чрез наш междинен модел на култивиране (в среда със серум и добавени фактори EGF и bFGF), растяха подобно на тези, отглеждани само с 10% FBS. (Фиг.12 А.) Тоест наблюдаваха се клетки с фибробластоподобна морфология, които залепваха за дъното на плаката и с времето формираха монослой.

В една от културите, въпреки че беше отглеждана при същите условия, клетките растяха във вид на невросфери, наред с наличието на адхерентни клетки. Такъв тип растеж в литературата се описва като семи-адхерентен. (Фиг.12 Б и В.)



**А**

**Б**



**В**

Фиг. 12 Типове клетъчен растеж при наш междинен модел.

А. Адхерентен тип;

Б. и В. Семиадхерентен тип растеж

Глиобластома мултиформе е злокачествен тумор, който поставя множество пролеми, не само в терапевтичен, но и в изследователски аспект. Клетъчното култивиране представлява класически подход в изучаването на клетките произхождащи от ГБМ. Въпреки, че този подход не дава цялостна информация за клетъчното многообразие на туморната микросреда, той би могъл да даде някои от така необходимите отговори за патогенезата на тумора. Както вече изяснихме, създадени са различни модели на клетъчно култивиране в опит да се пресъздадат максимално подобни условия на тези, при които ТСК съществуват в организма. Както вече беше споменато два са класическите модели за култивиране на ТСК от ГБМ – моделът на АК, култивирани със серум и без растежни фактори и моделът на НС, култивирани в безсерумна среда с EGF и bFGF.

Съществуват два основни аргумента против използването на серум при култивиране на клетките от ГБМ. Първият е, че кръвно-мозъчната бариера възпрепятства навлизането на клетки и големи молекули от кръвоносната система към ЦНС. Известно е обаче, че КМБ при този тумор е нарушена и това позволява навлизането на много повече кръвни

субстанции отколкото при интактна КМБ. Ето защо логично е да се предположи, че в естествената среда на ТСК присъстват много повече серумни вещества, отколкото в средата на нормалните НСК в техните ниши. Вторият аргумент е свързан с факта, че под влияние на някои субстанции, намиращи се във феталния телешки серум, като Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), клетките частично губят своя „стволов” характер и се диференцират. (*Westermarck 2012*)

Използването на EGF и bFGF за клетъчно култивиране на ТСК от ГБМ се базира на данните, че под тяхно действие клетките изолирани от ГБМ пролиферират. (*Yung et al. 1982*), като bFGF служи като ядрен регулатор на пролиферацията на астроцити или на неопластични клетки от глиални тумори (*Joy 1997*) Човешките глиомни клетъчни линии имат висока експресия на рецептора за EGF (EGFR), която се дължи на EGFR генна амплификация (*Westermarck 2012*), като ко-експресията на EGF и рецептора му при ГБМ най-вероятно води до автокринно въздействие на този фактор. (*Bachoo et al. 2002, Hambardzumyan et al. 2008, Fomchenko et al. 2006, Li et al. 2009*) Известно е още, че ТСК имат способността да се диференцират до неврони и глиални клетки при премахването на тези фактори и добавяне на кръвен серум. (*Shiffer et al. 2012*) Този факт, по-високата експресия на маркери, характерни за НСК (Nestin, Sox-2, CD133) и ниската експресия на диференциационни маркери като GFAP са доводи сочещи невросферите, култивирани в безсерумна среда с EGF и bFGF като по-добър модел за клетъчно култивиране в сравнение с адхерентните клетки, култивирани със серум без фактори. НС също имат по-висок потенциал за самообновление и туморогенност и имат същите генетични алтерации като пълвичния тумор. (*Kyurkchiev 2014*) Съществува, обаче и мнението, че двата вида клетъчни култури не са толкова ясно отграничени по отношение потенциала си да формират ТСК. Тази теза се потвърждава от факта, че адхерентни клетки, култивирани със серум, формират по дъното на плаката агрегати, наподобяващи невросфери и когато бъдат преместени в среда без серум могат да формират НС. (*Schiffer et al. 2012*) Също така е описан растеж, известен като „семиадхерентен”, тоест в една култура успоредно се развиват както НС, така и АК. (*Kyurkchiev 2014*) Тези данни насочват изследователите към търсене на междинни модели, съчетаващи свойствата на класическите два.

В литературата са описани два междинни модела на клетъчно култивиране, използващи тъканни плаки покрити с ламинин и polyHEMA и данните от тях също сочат липсата на стриктна разлика между НС и АК по отношение на техния потенциал да формират ТСК. При първият от тях авторите използват ламинин, който води до прилепване на

клетките и формирането на типични АК, въпреки наличието на EGF и bFGF и липсата на серум. При другия междинен модел наличието polyHEMA възпрепятства клетъчната адхезия, независимо от наличието на серум и отсъствието на фактори. Клетките формират т.нар. „серумни сфери”. (*Gilbert and Ross 2009; Hong et al. 2012*) Според авторите на двата междинни модела, те превъзхождат класическите по отношение на наличието на ТСК.

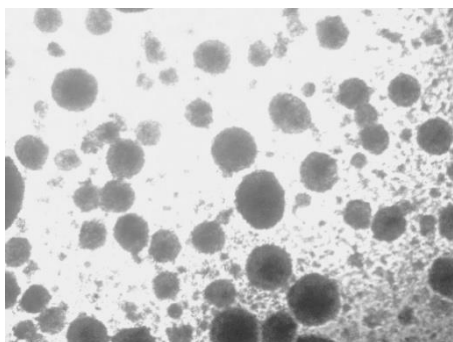
Въз основа на описаните литературни данни нашият екип разработи свой „междинен модел“, комбиниращ влиянието на EGF, bFGF и феталния телешки серум, тоест клетките бяха култивирани и с трите субстанции. Нашите аргументи подкрепящи разработването на този модел за култивиране бяха формирани на базата изложените данни в научната литература за:

1. Микросредата характерна за нишите, обитавани от ТСК при нарушената КМБ при ГБМ.
2. Клетъчното култивиране на клетки от ГБМ по двата класически модела и по други междинни модели, коментирани по-горе. В нашият модел наблюдаваният АК растеж потвърждава мнението, че в серума има субстанция/ии, водещи до този тип клетъчен растеж. Една от клетъчните култури, въпреки че беше култивирана по абсолютно същия начин като останалите, прояви „семи-адхерентен“ растеж. Този факт може да се отдаде на различните типове ГБМ, описани в литературата и на разликите в ТСК, от които те произхождат.

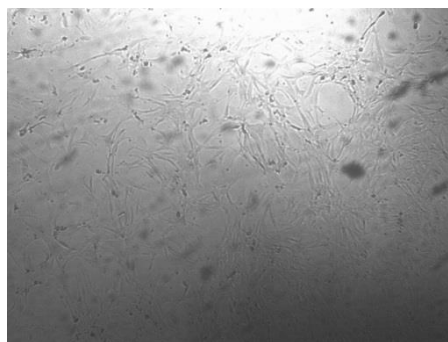
## **5.4. Преминаване на един в друг вид клетъчен растеж при ГБМ клетъчни култури**

### *Преминаване на невросфери в адхерентни клетки*

Както беше казано, в литературата има данни, че клетки култивирани с необходимите растежни фактори, растящи като НС, могат да се трансформират в адхерентни клетки, ако бъдат поставени в серумна среда. Опитната постановка беше проведена с получените НС, като при поставянето им в среда със серум НС се държаха по описаният от останалите екипи начин и формираха монослой от адхерентни клетки. (Фиг. 13)



А.



Б.

Фиг. 13 Преминане на клетки, растящи като НС в АК при добавяне на серумна среда.

А. Клетки, изолирани от ГБМ, растящи като НС.; Б. Клетки, растели като НС, които след поставянето им в среда със серум проявяват адхерентен растеж и формират монослой.

#### *Преминане на адхерентни клетки в невросфери*

При опити клетъчни култури с адхерентен растеж да формират невросфери чрез поставянето им в среда за НС, не беше установен положителен резултат нито за класическите АК (култивирани само със серум), нито за клетките от нашия междинен модел. Адхерентните клетки запазиха формата и начина си на растеж независимо от културелната среда.

В научната литература има, макар и малко данни, че клетки, изолирани от ГБМ и култивирани като АК по класически модел могат да се трансформират до НС при пренасянето им в среда за култивиране на НС. (*Caldera et al. 2011*) Нашите опити, обаче, не потвърдиха тази информация. Резултатите ни по-скоро подкрепят традиционното схващане, че телешкият серум, в който се култивират ГБМ клетките при АК модел, поради съдържанието си на някои фактори като BMP-4, води до частична трайна и невъзвратима диференциацията на ТСК, израз на която е запазения адхерентен фенотип. (*Westermarck 2012*)

Акцентът на резултатите описани по-нататък пада върху клетки култивирани по описания от нас междинен модел – едновременно със серум и фактори (EGF, bFGF). Причината за това е, че класическите модели са добре описани от други екипи преди нас. Разбира се, изследвания бяха направени и на клетъчните култури, получени по двата класически метода, като резултатите от тях ще бъдат включени и опоменати, където са налични.

## 5.5. Експресия на маркери, характерни за ТСК и НСК, от клетъчни култури от ГБМ

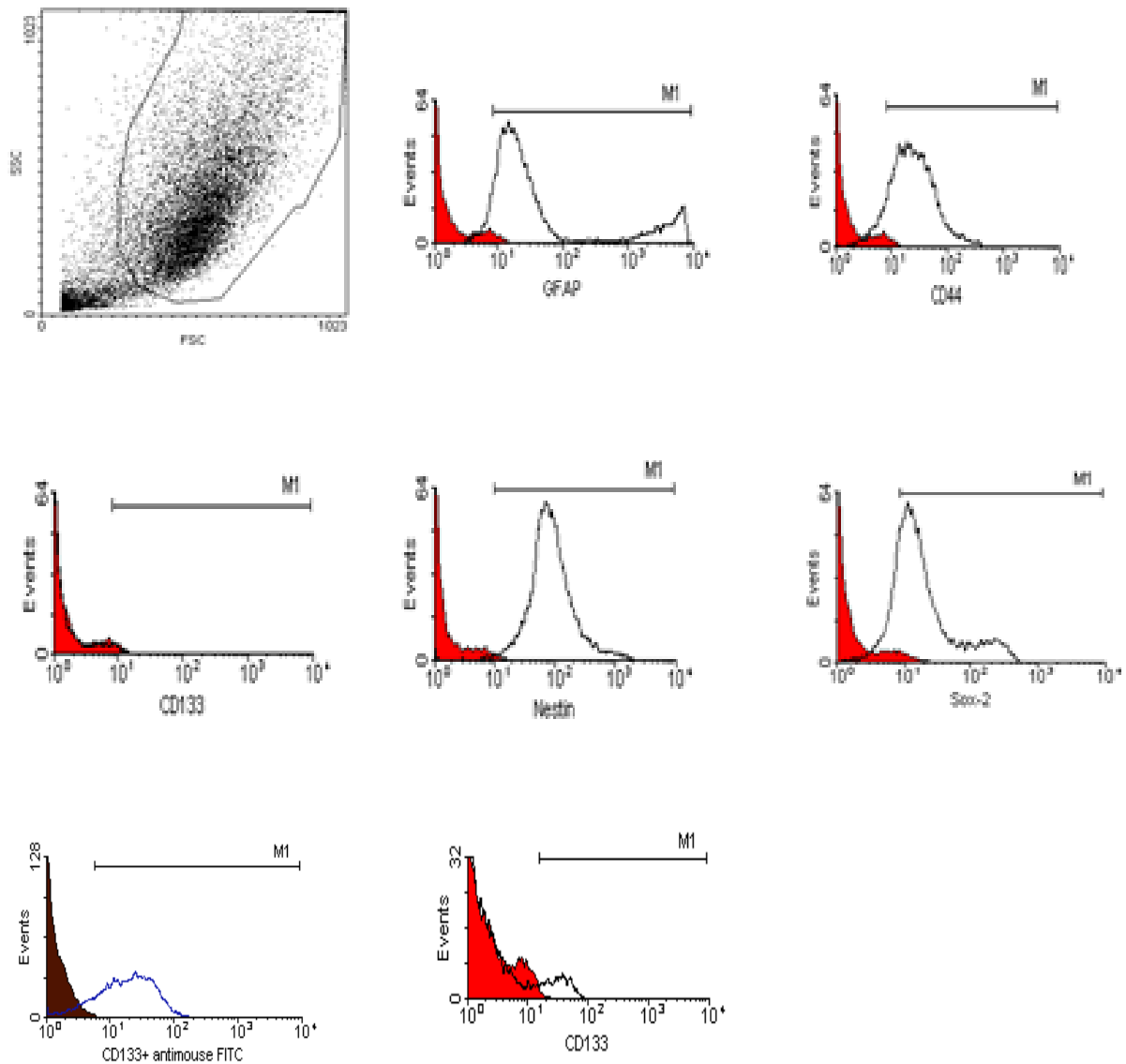
Основно изискване за доказване на клетки, изолирани от ГБМ е експресия на някои маркери. Маркерите Nestin, GFAP, Sox-2, CD44 и CD133 се смятат за специфични за НСК и произлизащите от тях ТСК и позволяват фенотипизирането на експресиращите ги клетки като такива. Два от тези маркери се експресират на повърхността на клетките (CD44 и CD133), а три са интрацелуларни (Nestin, Sox-2 и GFAP). Както вече беше споменато Nestin е цитоплазмен филамент, участващ в изграждането на цитоскелета, клетъчният метаболизъм, клетъчната сигнализация и органелогенезиса. Той се експресира от НСК, като при процеса на диференциация се заменя от неврофиламенти, най-вече GFAP. (*Cattaneo et al. 1990, Messam et al. 2000*) GFAP се описва като маркер на астроцитна диференциация, но както НСК, така и ТСК могат да експресират Nestin самостоятелно или заедно с GFAP. (*Gilbert et al. 2009; Dimov et al. 2010; Matsuda et al. 2013*) Sox-2 е транскрипционен фактор, експресиран в цитоплазмата на НСК, който се свързва с процесите на самообновление и диференциация. (*Azuara et al. 2006, Lee et al. 2006*) При ТСК неговата локализация е в ядрото и се свързва с дезорганизация на диференциацията. (*Gilbert et al. 2009; Gursel et al. 2011*) Адхезионната молекула CD44 е един от най-важните маркери на НСК. Оказва се, обаче, че тя се експресира и от ТСК, като участва в процесите на инвазия към заобикалящата ги тъкан. (*Matsuda et al. 2013*) CD133 е повърхностна молекула, експресирана от НСК, която предизвиква огромен интерес в научните среди. Функциите и все още не са напълно изяснени, но се предполага, че участва в механизмите на клетъчен поляритет, миграция и взаимодействието на невралните стволови клетки със съседните им клетки и/или извънклетъчния матрикс. (*Zhang et al. 2008, Beier et al. 2008, Uchida et al. 2000, Kania et al. 2005*) При диференциацията си НСК спират експресията на този маркер. Установено е, че някои от ТСК експресират CD133, като някои автори смятат, че именно тези клетки са истинските, най-недиференцирани и стоящи на върха в туморната йерархия туморни стволови клетки. (*Veselska et al. 2006; Singh et al. 2004*)

Експресията на споменатите пет маркера беше изследвана при клетки, изолирани от ГБМ и култивирани по наш междинен модел, с цел да се установи дали те носят фенотипната характеристика на ТСК.

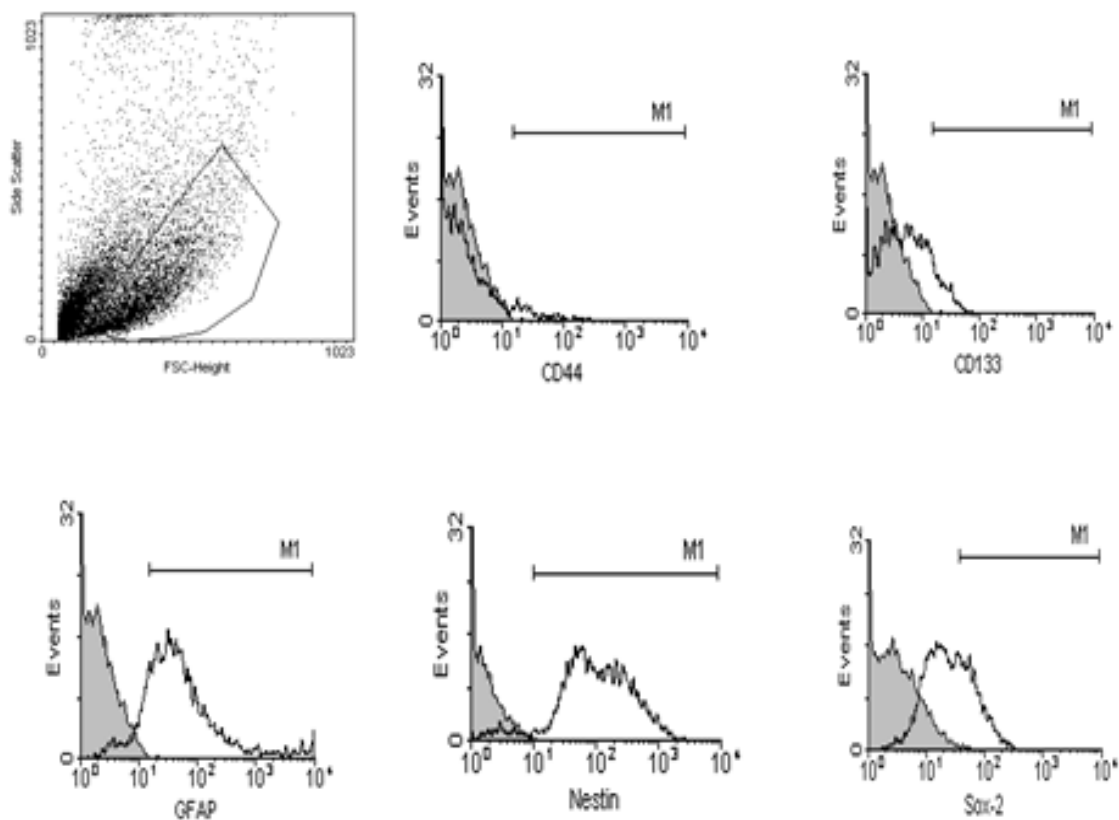
### 5.5.1. Резултати получени чрез флоуцитометричен метод на изследване

Флоуцитометричен анализ на клетъчните култури от ГБМ беше използван за установяване експресията на описаните маркери – Nestin, GFAP, Sox-2, CD133 и CD44. За всички флоуцитометрични изследвания проведени върху клетъчни култури от ГБМ беше използвана отрицателна контрола. Беше установен висок процент клетки, експресиращи Nestin, GFAP, Sox-2 и CD44 при всички изследвани култури. (Фиг. 14) Резултатите показаха, че при клетъчни култури от ГБМ, култивирани по нашия междинен модел средно 97.1% от клетките експресираща Nestin, 79.3%-Sox-2, 78.8%-CD44 и 71.3%-GFAP. При изследването на CD133 получихме положителни резултати при 4 от клетъчните култури, като две от тях показаха силна експресия на маркера – средно 70,2%, а другите две по ниска експресия – 17,3%. (Фиг. 14) Останалите клетъчни култури бяха отрицателни за този маркер.

Клетъчни култури, растящи като НС бяха тествани за същите маркери. Средните стойности за експресия бяха следните – Nestin-86,3%, Sox-2-30,7%, GFAP-74,1%, CD44-8,7%, CD133-12,6% от клетките в клетъчната култура. НС показаха висока експресия за маркерите Nestin и GFAP, подобно на клетките от междинния модел. Беше наблюдавана разлика при експресията на Sox-2 и CD44, която беше значително по-слаба. По отношение на CD133 – всички тестваните култури го експресираща, макар и при малък процент от клетките. (Фиг. 15)

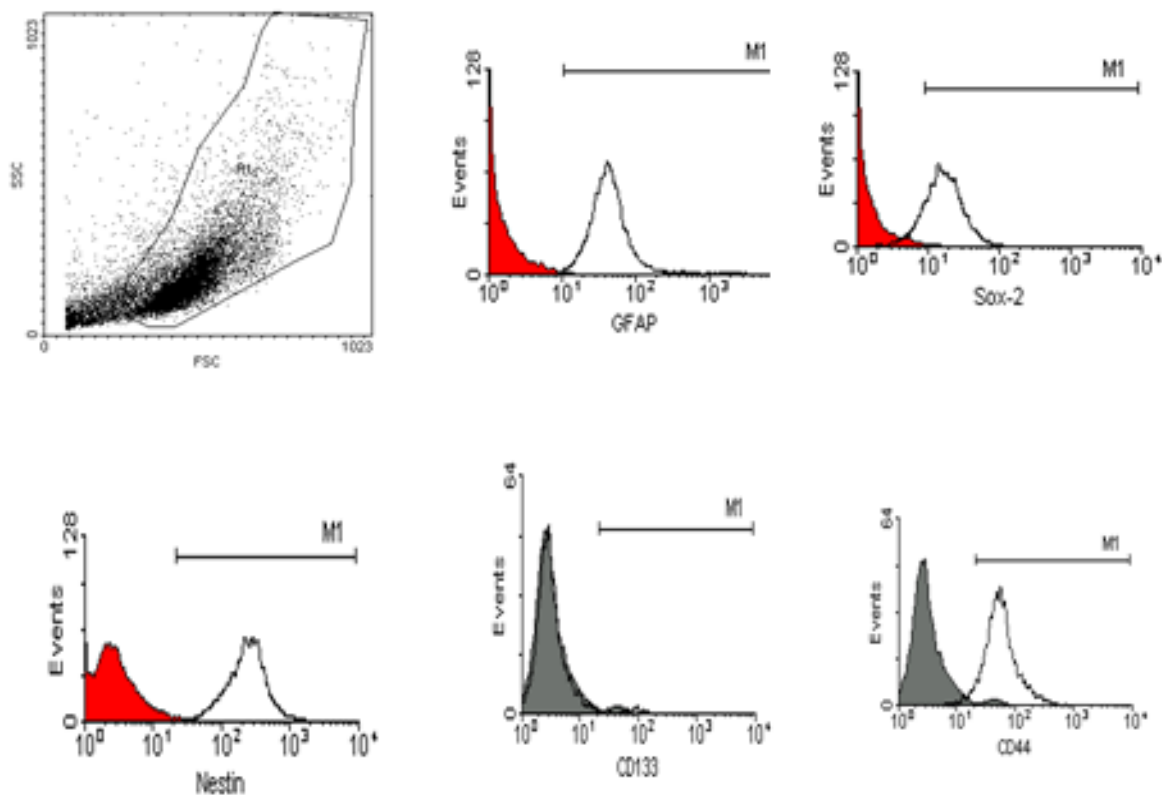


Фиг. 14 Флоуцитометрична експресия на основните маркери типични за неврални и туморни стволови клетки, установена при наш междинен модел. На последните две хистограми са представени някои клетъчни култури с различна експресия на CD133 маркера.



Фиг. 15 Флоуцитометрична експресия на основните маркери типични за неврални и туморни стволови клетки при модел на клетъчно култивиране НС.

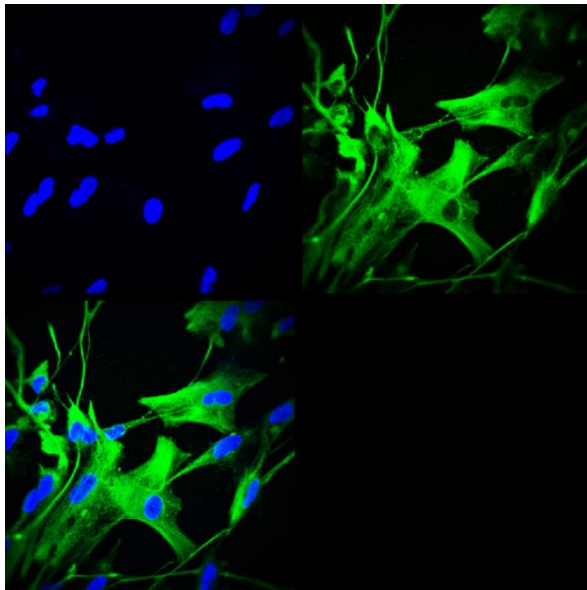
Две от клетъчните култури, формиращи НС и трансформирани до АК след добавяне на серум бяха изследвани за маркери, характерни за ТСК. Процентът клетки, експресиращи маркерите, беше сходен с този установен при клетки от нашия междинен модел. (Фиг. 16) По отношение на CD133 може да бъде добавен фактът, че въпреки, че изходните НС показаха експресия, макар и в нисък процент, при трансформираните АК експресия на този маркер липсваше.



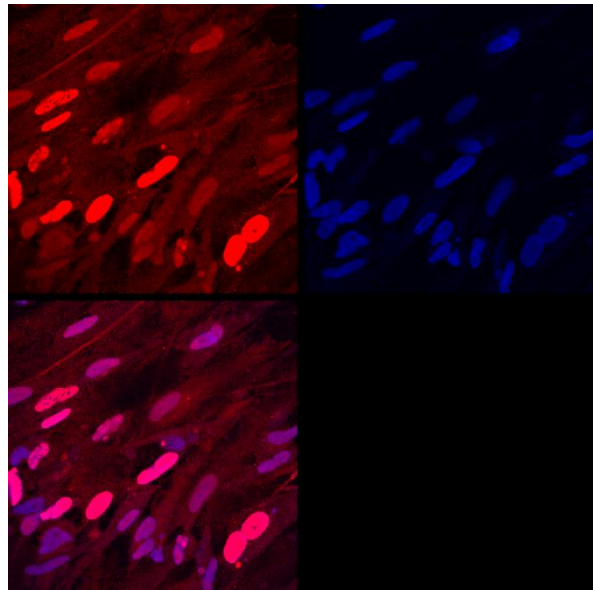
Фиг. 16 Флоуцитометрична експресия на специфични за НСК и ТСК маркери след като клетки разстящи като невросфери са трансформирани в адхерентни клетки

### 5.5.2. Резултати, получени чрез конфокална микроскопия

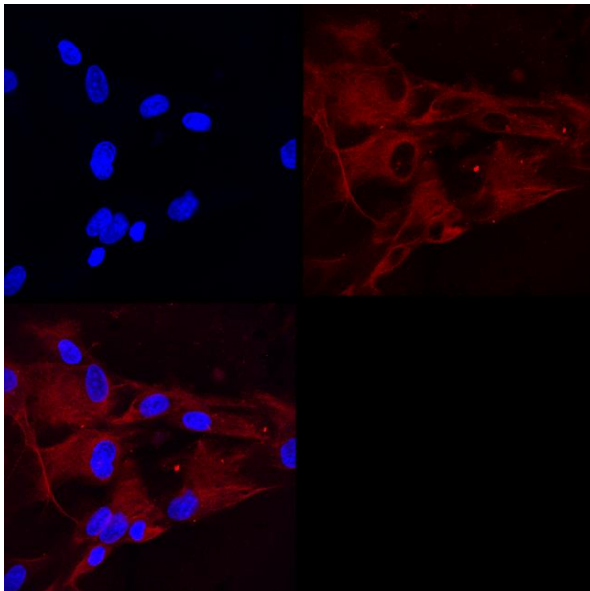
За по-голяма достоверност на получените чрез флоуцитометричен анализ резултати, експресията на Nestin и Sox-2 в клетъчни култури, получени от ГБМ, бяха изследвани и чрез имуноцитохимия и резултатите бяха отчетени чрез конфокална микроскопия. Всички изследвани култури показаха силна интрацелуларна експресия и на двата маркера. (Фиг. 17 А. и Б.) Изследване чрез конфокална микроскопия за същите маркери беше проведено и при клетки, отглеждани само с 10% FBS по класическия метод за АК. Клетките също показаха положителна експресия. (Фиг. 17 В. и Г.)



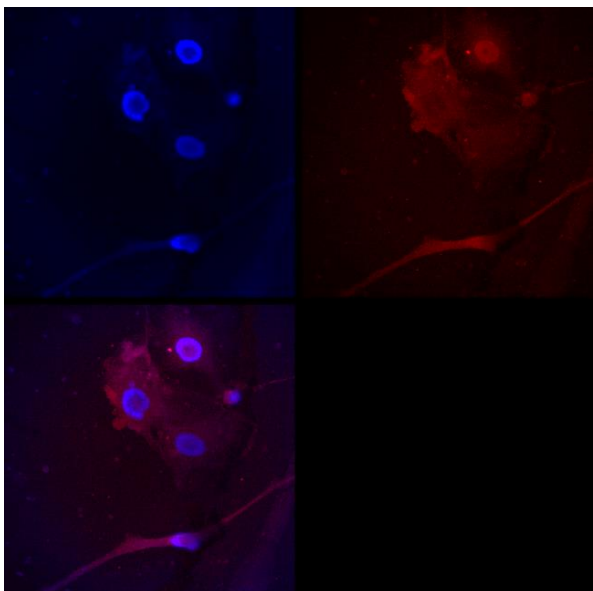
А.



Б.



В.



Г.

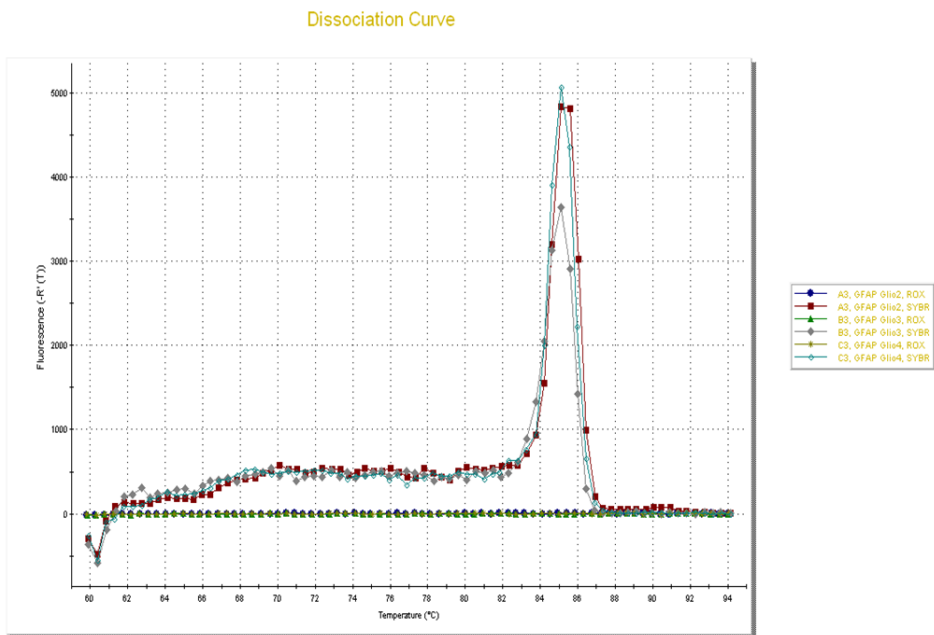
Фиг. 17 Изследване чрез конфокална микроскопия на клетки, изолирани от ГБМ.

А и Б. Изследване чрез конфокална микроскопия на клетки, отглеждани по наш междинен модел. Специфичната флуоресценция за Nestin се вижда в зелен цвят, тъй като второто анти-мише антитяло е белязано с Alexa Fluor 488, а за Sox-2 – в червен цвят, тъй като второто антитяло е белязано с Alexa Fluor 594.: А. Положителна експресия на Nestin ; Б. Положителна експресия на Sox-2. В и Г. Изследване чрез конфокална микроскопия на клетки, отглеждани само със серум. Специфичното оцветяване и за двата маркера се вижда в червен цвят, тъй като второто антитяло е белязано с Alexa Fluor 594. : В. Положителна експресия на Nestin; Г. Положителна експресия на Sox-2. Ядрата на всички препарати са оцветени с Hoechst 33258 и се виждат в син цвят.

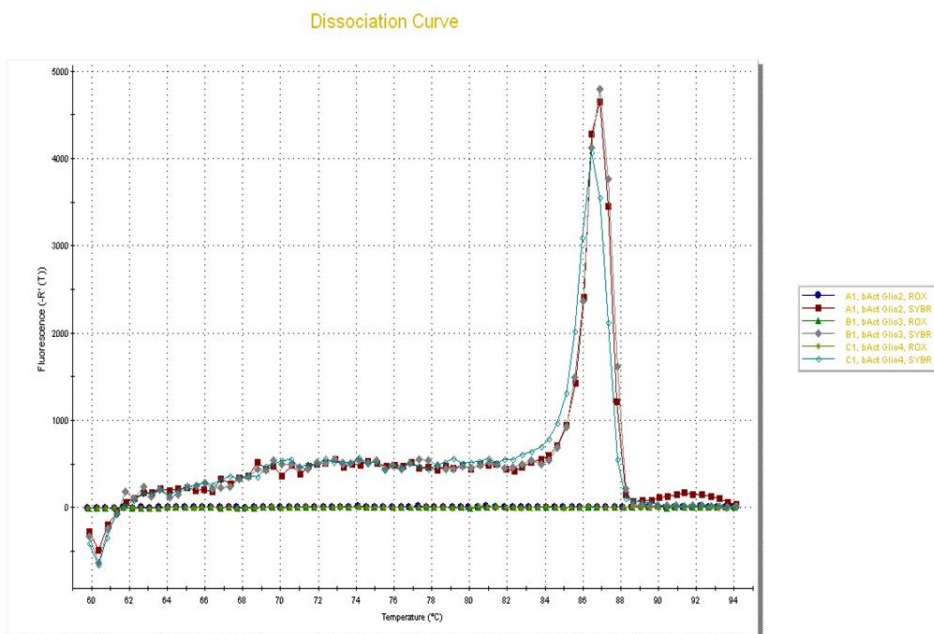
### 5.5.3. Резултати, получени чрез qRT-PCR изследване

С цел да установим експресията на маркерите не само на белтъчно ниво, но и на ниво РНК, беше изследвана експресия GFAP от 6 ГБМ клетъчни култури и чрез RT-PCR в реално време (qRT-PCR). Като вътрешна контрола на изследването беше използван  $\beta$ -actin, за които е известно, че има константна експресия във всички клетъчни типове и не се повлиява от извършените третираня на клетките. Получената дисоциационна крива с еднопиков профил показва, че продуктът от амплификацията на копиДНК е чист от неспецифични продукти. Получената копиДНК беше изследвана чрез електрофореза в 1,5% агарозен гел. Положителни резултати за GFAP експресията бяха получени за всички, изследвани ГБМ клетъчни култури. (Фиг.18 А., Б., В.)

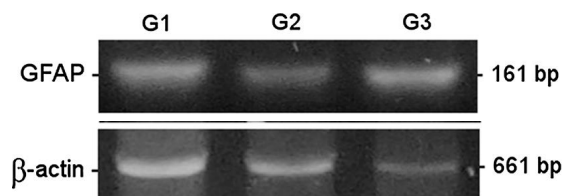
Резултатите получени при изследване на маркери, характерни за ТСК при клетки, изолирани от ГБМ могат да се обобщят по следния начин: 1) Клетки култивирани по наш междинен модел и като невросфери, показаха експресия на маркерите Nestin, GFAP, Sox-2 и CD44, изследвана чрез флоуцитометричен анализ. Положителна експресия на CD133 беше отчетена при 4 от култивираните по наш междинен модел клетки и при всички, култивирани по модел за получаване на невросфери. 2) Чрез конфокална микроскопия беше потвърдена експресията на маркерите Nestin и Sox-2 при клетки култивирани по наш модел и по класически модел за получаване на адхерентни клетки. 3) qRT-PCR беше приложен на клетки култивирани по наш модел, за да бъде потвърдена експресията на маркера GFAP. Положителната експресия на тези маркери от изолираните от ГБМ и култивирани клетки ни даде основание да изкажем хипотеза, че това са туморни стволови клетки и да продължим с изследването им в тази посока. Установената експресия не е достатъчно доказателство, за да може тези клетки да се нарекат ТСК, тъй като е необходимо още да се докаже имат ли способност за самообновление, показват ли диференциация в характерните за НСК клетъчни типове и туморогенни ли са при инжектирането им в животински модели.



A.



Б.



В.

Фиг. 18 Изследване експресията на GFAP при клетъчни култури от ГБМ: А. Дисоциационна крива с еднопиков профил, показваща наличие на продукт от амплификацията на копиДНК при изследване на GFAP в 3 клетъчни култури от ГБМ чрез qRT-PCR; Б. Дисоциационна крива на използвания като вътрешна контрола  $\beta$ -actin В. Агарозен гел, показващ продукт от копиДНК след амплификация чрез qRT-PCR. PCR продуктите бяха съставени от 161bp фрагмент за GFAP и от 661bp фрагмент за  $\beta$ -actin.

Туморните стволови клетки, изолирани от ГБМ се изследват от различните научни екипи чрез няколко модела на клетъчно култивиране, които бяха разгледани по-горе (адхерентни клетки, невросфери и междинни модели). Различните модели клетъчни култури показват и различно ниво на експресия на маркерите, характерни на ТСК. НС се считат за моделът, при който получените клетки се доближават най-много до ТСК *in vivo*, от които произхожда туморът и които са отговорни за неговото поддържане и растеж. Клетките на този тип култури се характеризират с експресия на Nestin, Sox-2 и CD44. (Lee et al. 2006; Shifer et al. 2012) По отношение на маркера GFAP е установено, че някои култури го експресират, а други – не. За CD133 има разнородни данни в литературата, като някои автори твърдят, че единствено положителни по този маркер ТСК могат да формират НС. (Singh et al. 2004) Други, обаче, показват, че и клетки неекспресиращи този маркер могат да формират НС и да показват характеристики на ТСК. (Brescia et al.2013; Caldera et al. 2011) Резултатите, които нашият екип получи при култивиране на клетки, изолирани от ГБМ и култивирани в среда за НС, потвърждават данните за експресия от този тип клетъчни култури на Nestin, Sox-2, CD44 и GFAP. Култивираните от нас НС показаха едновременна експресия на голям брой клетки на интермедиерните филаменти Nestin и GFAP. Всички култури показаха макар и не голям процент клетки експресиращи CD133, като този факт по-скоро потвърждава хипотезата, че CD133+ клетки участват при формирането на НС. Изследването, което проведохме за експресията на маркери при преминаване на НС в АК потвърди публикациите съобщаващи, че при култивиране на НС в среда със серум, те губят способността си да експресират CD133.

За АК се смята, че са частично диференцирани под влияние на фактори присъстващи във феталният телешки серум, който се използва за култивирането им, като това влияе и върху експресията на маркери от тези клетки. (Lee et al. 2006) Според литературните данни този тип клетъчни култури показват по-ниска експресия на Nestin и Sox-2 в сравнение с НС, като Nestin може и да липсва. За разлика от НС при тях експресията на GFAP е много силна, като двата интермедиерни филамента (Nestin и GFAP) могат да се експресират едновременно. Култивирането със серум води и до загуба на експресията на CD133. (Yuan et al. 2004; Shiffer et al. 2011; Caldera et al. 2011) Нашите изследвания показаха едновременна експресия на Nestin и Sox-2 при клетки култивирани по класически модел за АК. В съответствие с данните в научната литература Sox-2 имаше ядрена локализация.

Стремежът клетъчните култури от ГБМ, отглеждани *in vitro* да се приближат максимално до условията *in vivo* и клетките да са възможно най-близко „копие“ на ТСК, смятани за родоначални за туморната маса, води до създаването на така наречените „междинни модели“, които вече бяха споменати. Единият от предложените модели представлява клетъчни култури, растящи в плаки покрити с ламин и безсерумна среда с фактори EGF и bFGF. Според авторите този модел на култивиране позволява факторите да въздействат на по-голям брой клетки в сравнение с НС, като се избягва негативният ефект на серума. Действително изследванията за експресията им на ТСК маркери показват, че почти всички клетки експресират Nestin, Sox-2, CD44 и CD133. По отношение на GFAP клетъчните култури проявяват слаба експресия или липса на такава. (Lee et al. 2006; Gilbert et al. 2009) Другият подобен модел използва плаки, покрити с poly-Нема, възпрепятстващи адхезията на клетките към дъното на плаката, като въпреки култивирането им само в присъствие на серум, се формират „серумни сфери“. Авторите докладват многократно по-висока експресия за маркерите Nestin, Sox-2 и CD44 в сравнение с класическите модели, въпреки, че липсва експресия на CD133. Клетките при този тип култивиране показват също повишена способност за миграция и формиране на колонии. (Hong et al. 2012)

Нашият модел на клетъчно култивиране беше създаден като комбинация от условията за култивиране на двата класически модела. Въпреки, адхерентният си растеж, наподобяващ класическия модел за АК, голям процент от клетките при този тип клетъчни култури показаха много силна експресия на Nestin, GFAP, Sox-2 и CD44. За разлика от моделът с ламинин съществен процент от клетките, култивирани по нашият междинен модел демонстрираха експресия на GFAP, но само две от културите показват висок процент експресия на CD133. Липсата при повечето клетъчни култури на маркера CD133, който при НС беше експесиран макар и от малко клетки при всички култури, може да се приеме като доказателство за влиянието на серума върху експресията на този маркер. Друга разлика, която наблюдавахме е експресия на Sox-2 и CD44, която при модела НС беше слаба, за разлика от тази при клетки култивирани по наш модел. Данните, изложени до тук показват, че междинните модели могат да покажат доста добра експресия на маркери, характерни за ТСК и могат логично да бъдат направени две предположения поне по отношение на проявявания фенотип: 1) Междинните модели са много близки до ТСК и могат да бъдат използвани като модел за *in vitro* изследвания или 2) Поставени при определени условия, клетки по-диференцирани от ТСК могат да експресират характерните за тях маркери. Съществува

и трета възможност – в туморната микросреда да са налични няколко различни популации от стволови клетки (туморни или не), част, от които да се развиват добре в среда със серум.

Маркерите, които използвахме за фенотипизиране на клетките, изолирани и култивирани от ГБМ, се приемат за достоверни в научната литература при определяне на дадени клетки като ТСК. Има данни обаче, че експресията на тези маркери не е еднозначна. Nestin е маркер, който повечето автори недвусмислено свързват с невралните стволови клетки и техните прогенитори (*Michalczyk and Ziman 2005*) Оказва се обаче, че това не е точно така. *Wiese et al. 2004* показват, че този маркер се експресира от прогениторни клетки, които имат потенциал да се диференцират до невроектодермални, ендодермални и мезодермални клетъчни линии. Те също твърдят, че в тъканите на възрастни индивиди експресията на Nestin е ограничена до областите, в които протичат регенеративни процеси и предполагат, че той е характерен маркер за мулти-линейни прогениторни клетки, които имат и регенеративен потенциал и не са задължително рестриктирани в неврална посока.

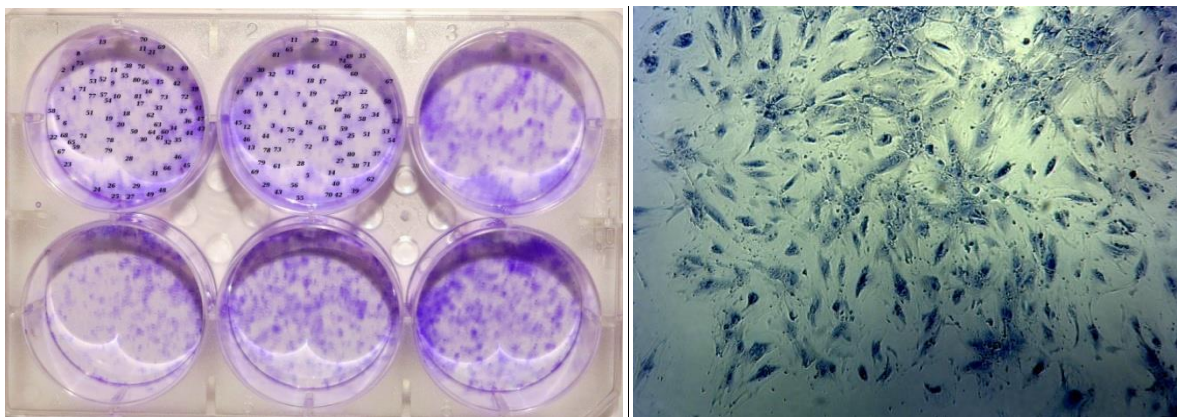
Sox-2 е вторият важен маркер, свързан с НСК и съответно с ТСК. Той е важен транскрипционен фактор, експресиран в ембрионалните стволови клетки, който участва в поддържането на стволово-клетъчната популация, в определянето на линейната им диференциация и е необходим при репрограмизиране на соматични клетки към плурипотентност. (*Takahashi and Yamanaka 2006; Adameyko et al. 2012; Sarkar and Hochedlinger 2013*) Изследвания върху експресията на Sox-2 сочат, че той се асоциира с различни типове ракови заболявания и дори е сочен като онкоген, който подпомага онкогенната сигнализация, участва в поддържането на раковите стволови клетки и регулира тяхното самообновление. (*Weina and Utikal 2014*) CD44 също е клетъчно-адхезионна молекула, която се експресира нормално от широк набор от клетъчни типове и тъкани, а също и при различни малигнени заболявания. (*Ulhen et al. 2015*). Експресия на CD133 се открива при много от нормалните тъкани, също и върху клетки при други малигнени заболявания, като колоректален карцином, повечето аденокарциноми, някои панкреатични, овариални и ендометриални неоплазии. (*Ulhen et al. 2015*) Дори GFAP не може да се счита за маркер, чиято експресия е строго ограничена до клетките на ЦНС, както ще бъде разисквано по-долу.

Всички тези данни създават възможност за спекулации относно ролята на „ТСК маркерите“ за категоричното идентифициране на ТСК.

## 5.6. Потенциал за самообновление на ГБМ клетъчни култури

Способността за самообновление в клетъчна култура е отличително свойство на стволовите клетки, както и на туморните стволови клетки. Изразява се в способността на единични клетки да формират колонии при *in vitro* условия, вследствие на симетрично деление. За първи път този метод е описан през 1956г. от Ruck и Marcus, като днес е широко използван и считан за „златен стандарт“ при предклиничен анализ на податливостта на ракови клетки към прилагането на различни медикаменти и радиация. (Mirzayans et al. 2007).

С цел да се докаже наличието на ТСК в нашите условия на култивиране на ГБМ клетки, клетъчни култури от ГБМ бяха изследвани за свойството самообновление чрез тестове за клоногенност, като резултатът беше положителен при всички тествани култури. Клетките образуваха ясно разграничими колонии със сходни характеристики (Фиг. 19 А. и Б.) Способността за самообновление беше описана за около 2% от клетките в клетъчните култури, което отговаря на процента ТСК от общата туморна маса, описан в литературата за глиобластома мултиформе.



А.

Б.

Фиг. 19 Клоногенен растеж на клетки от ГБМ клетъчни култури, култивирани по наш междинен модел (оцветяване с Crystal violet). А. и Б.

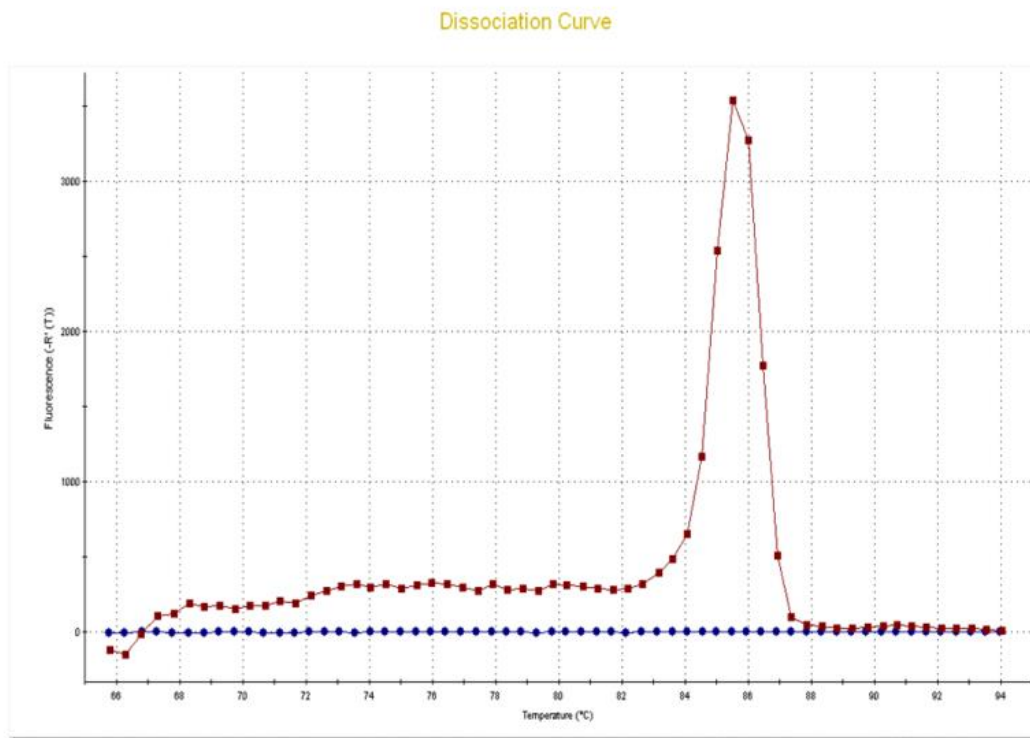
Клоногенността или самообновлението е свойство характерно за клетки, способни на симетрично деление, при което се получават клетки идентични по фенотип с майчината и помежду си и с потенциал да създадат клетъчна популация, поради задържане на процеса на диференциация. (Bianco et al. 2008) Способността за самообновление е

основното свойство на стволовите клетки във възрастен организъм, което позволява поддържането на определен обем (пул) от тези клетки във всички тъкани при липса на диференциация. В този смисъл процесът на диференциация може да се приеме като противоположен на самообновлението. В организма тези два процеса са фино регулирани, като осигуряват обновлението и поправката на тъканите през целия живот. (Seita and Weissman 2010) Способността за самообновление е описана и при много ракови стволови клетки, включително и при ГБМ. Това е един от основните процеси, който в комбинация с дезорганизацията на сигналните пътища, насочващи малигнените клетки към диференциация и апоптоза, води до неконтролируем растеж и устойчивост на терапия. Данни от научната литература сочат, че първични клетъчни култури, изолирани от ГБМ и формиращи невросфери съдържат мултипотентни прекурсори, способни на продължително самообновление. (Galli et al. 2004) Методът за установяване на клоногенност, приложен при клетъчните култури от ГБМ, отглеждани по наш междинен модел, показва, че всички, изследвани такива култури проявяват свойството самообновление. Това може да се приеме като още едно потвърждение на предположението, че тези клетки притежават характеристики на ТСК. Както вече споменах, обаче, за да твърдим убедено, че клетките култивирани по описаният метод са ТСК, е необходимо да се докаже способността им за туморогенност, както и способност за трилинейна диференциация в невронални, астроглиални и олигодендроглиални клетъчни линии. Тъй като самообновлението е характерно за всички стволови клетки във възрастния организъм, проявата му от клетките, отглеждани по наш модел на практика потвърждава тяхната стволовост, но не отхвърля изказаното по-горе предположение, че това може да са друг тип стволови клетки, налични в микросредата на ГБМ.

## 5.7. Експресия на Stat1 в клетъчни култури от ГБМ

Молекулите от системата „Stat” са ключови в сигнализацията на клетките и заемат съществено място в развитието на туморните процеси. Както беше споменато по-горе, при изследване на срези от ГБМ не беше установена експресията на Stat1, който се счита за фактор, благоприятстващ оздравителните процеси и неучастващ в туморогенезата. Оказа се обаче, че клетъчните култури от ГБМ, култивирани по наш

модел показват експресия на иРНК на този фактор, която беше установена чрез qRT-PCR. (Фиг. 20) Получените дисоциационни криви след амплификацията на копиДНК бяха с еднопиков профил, което доказва липсата на амплификация на неспецифични продукти.



А.

Фиг. 20 Дисоциационна крива, показваща амплификация на копиДНК на Stat1, получена от клетъчни култури, отглеждани по междинен модел.

Stat-1 е транскрипционен фактор, който може да се активира от много секреторни фактори като  $IFN\alpha$  и  $IFN\gamma$ , интерлевкините IL-6 и IL-10, растежни хормони и тромбопоетин. (Haybaeck et al. 2007) Той може да инхибира растежа и да съдейства за индуциране на апоптозата в нормални и туморни клетки. (Kaplan et al. 1998). Както вече беше изложено, съществуват и научни данни за протуморно действие на този фактор, под действие на IFNs, изразяващо се в устойчивост на радиация в туморни модели, включително и на глиални тумори. Предполага се, че продължителната активация на Stat1 от IFNs и други стресови сигнали индуцира гени за преживяемост. (Khodarev et al. 2007; Duarte et al. 2012) Наличието на иРНК на този фактор в култивираните от нашият екип клетъчни култури и липсата му при ИХХ изследване на хистохимични срезове от ГБМ може да се обясни чрез наличие на фактори в средата на

клетъчните култури, които индуцират експресията му. Съществува, обаче и възможност липсата на фактори секретирани нормално в средата на ГБМ да предизвиква експресията му, като изясняването на този въпрос се нуждае от провеждане на допълнителни изследвания.

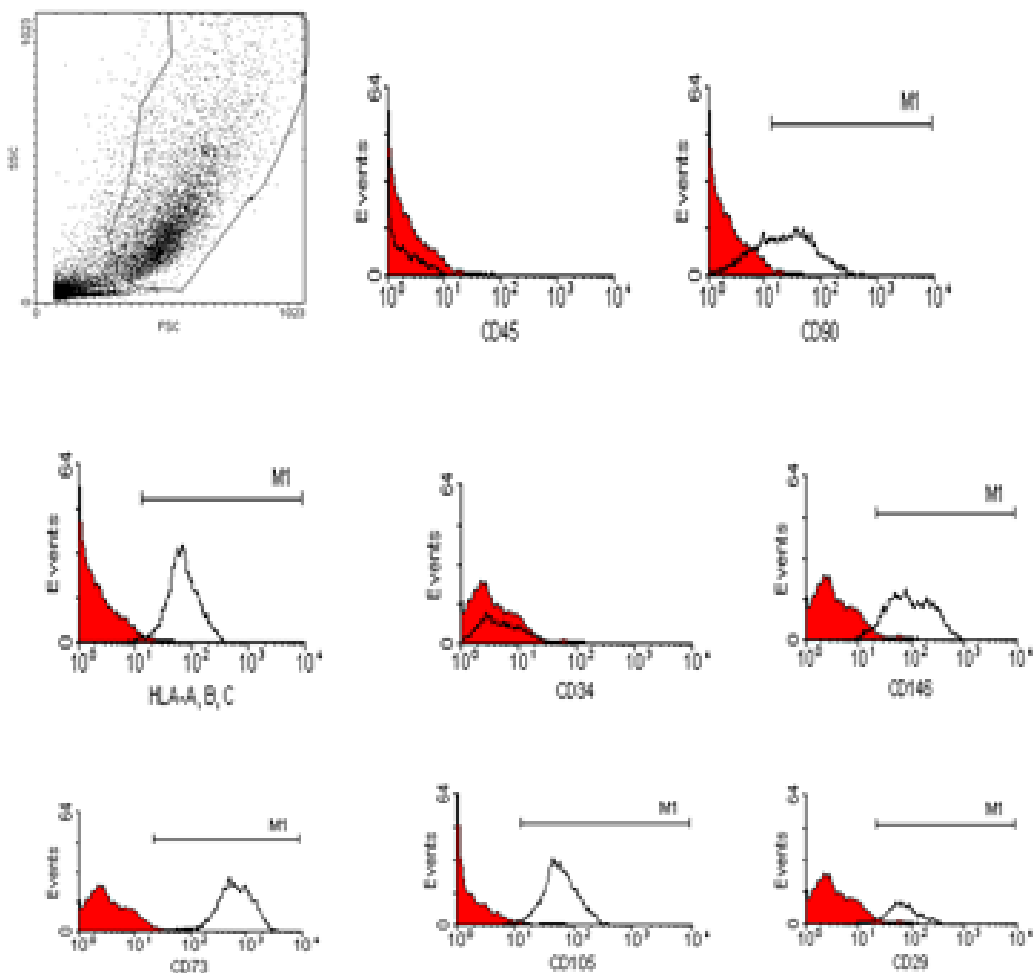
## 5.8. Експресия на маркери, характерни за МСК от клетъчни култури от ГБМ

Характерната морфология на клетките, описана при нашия междинен модел (фибробластоподобни, залепващи и образуващи монослой), както и способността им за самообновление, описана по горе, не са свойства характерни единствено за туморните стволови клетки. Мезенхимните стволови клетки (МСК) също притежават тези характеристики (*Pittenger et al. 1999*). Това подобие в растежа и морфологията, както и в способността за самообновление на два типа клетки, до скоро считани за напълно различни, ни накара да изследваме култивираните по наш междинен модел клетки, изолирани от глиобластома мултиформе в посока МСК, според минималните критерии на ISCT (International Society for Cellular Therapy). (*Dominici et al. 2006*) Според тези критерии, за да бъдат определени едни клетки като МСК, те трябва 1) да прилепват към дъното на плаката, в която са култивирани, при стандартни културелни условия; 2)  $\geq 95\%$  от клетките да експресират маркерите CD73, CD105 и CD90, както и да липсва експресия на CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79a или CD19 и HLA клас II и 3) да са способни да се диференцират до остеоцити, хондроцити и адипоцити. МСК са едни от най-изследваните и дискутирани стволови клетки през последните години. За МСК в ЦНС до скоро въобще не се говореше, но сега въпросите „Има ли ги там?“ и „Каква е ролята им?“ вече са на дневен ред. Установено беше, че ГБМ клетките, култивирани по наш модел експресират на повърхността си изброените маркери и то при над 90% от клетките и също като МСК са отрицателни (или незначителен процент положителни) за CD45 и CD34. Клетъчните култури от ГБМ бяха тествани и за експресия на HLA клас I молекули и CD146, също експресирани от МСК, като при всички, изследвани култури беше отчетен висок процент клетки, експресиращи и тези маркери. (Фиг. 21)

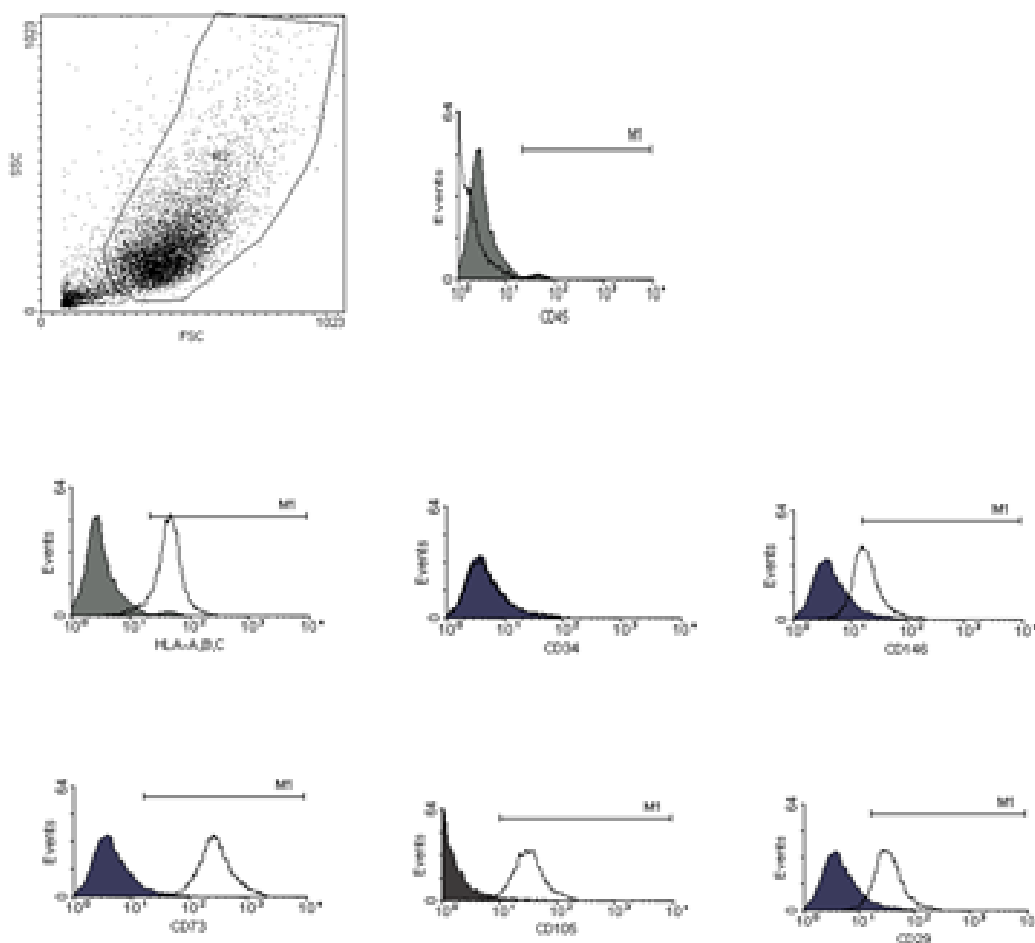
Важно е да се отбележи, че клетъчните култури, растящи като невросфери, също бяха тествани за споменатите маркери, но те не показаха експресията им (данните не са

показани) Както беше споменато невросфери поставени в среда за адхерентни клетки, придобиват съответната морфология. Наред с това те започват да експресират и маркерите за МСК, тоест показаха липса на експресия за CD34 и CD45 и голям процент клетки положителни за CD73, CD90, CD105, CD29, CD146 . (Фиг.22) Обратно АК, с които бяха направени опити да бъдат трансформирани в НС, също бяха изследвани за изброените маркери, като те запазиха експресията си на CD73, CD90, CD105, CD29, CD146.

Получените резултати поставят два основни въпроса: 1. Представяват ли т.нар. адхерентни клетки, изолирани от ГБМ мезенхимни стволови клетки? 2. Възможно ли е условията при които са култивирани клетките да водят до формиране на различен от ТСК вид стволови клетки?



Фиг.21 Флоуцитометрично изследване на маркери, характерни за МСК, при клетки, изолирани от ГБМ. На фигурата са представени хистограми, показващи положителна експресия за CD73, CD90, CD105, CD29, CD146 и HLA-A,B,C и липса на експресия за маркерите CD34 и CD45 при клетъчни култури, от ГБМ отглеждани по наш междинен модел.



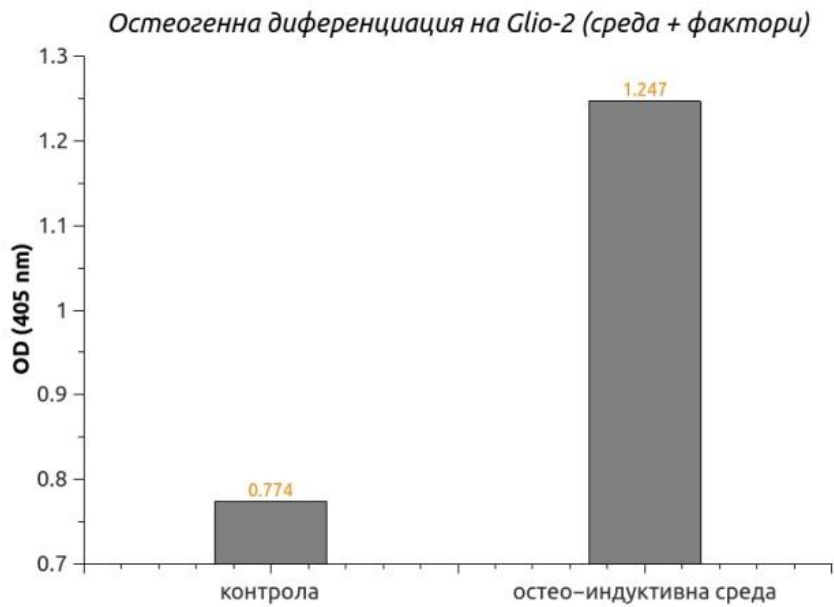
Фиг. 22 Флоуцитометрично изследване на маркери, характерни за МСК, при клетки, култивирани като НС и трансформирани в АК. Хистограмите представени на фигурата показват експресията на маркери, характерни за МСК от НС, трансформирани в АК след поставянето им в среда със серум и bFGF и EGF. Клетките показват експресия на CD73, CD105, CD29, CD146 и HLA-A,B,C и са негативни за CD34 и CD45.

### 5.9. Остеогенна и адипогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ

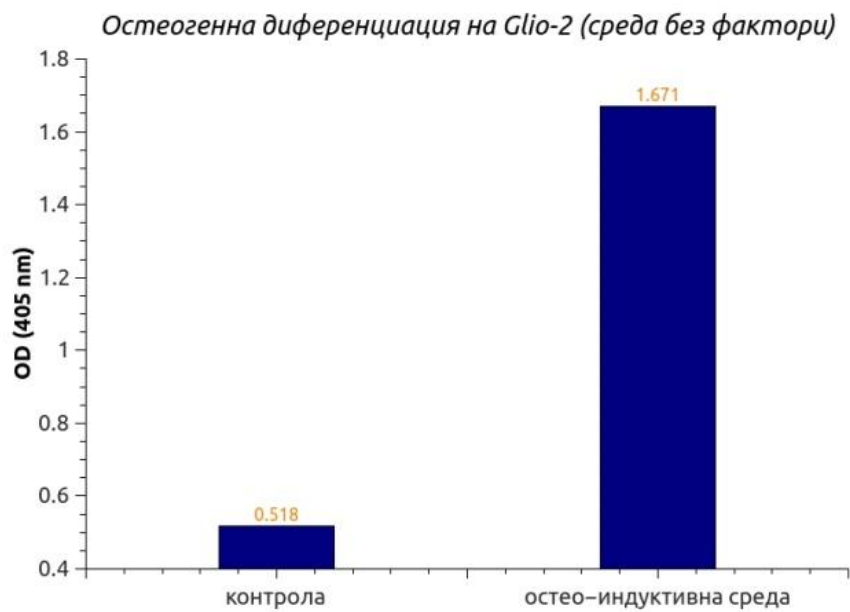
На базата на описаните дотук аналогии между клетките изолирани от ГБМ и култивирани по наш модел (морфология, самообновление и фенотип), както и в опит да се отговори на първия въпрос ние продължихме да изследваме свойства типични за МСК. За МСК е характерно, свойството да се диференцират до клетки от остеогенния, хондрогенния и адипогенния ред. Предвид установените прилики между МСК и ГБМ клетъчни култури, бяха направени опити за диференциация на вторите до остеоцити и адипоцити.

След култивирането на клетките от наш модел в остеоиндуктивна среда за 21 дни, степента на остеогенна диференциация на клетките от ГБМ клетъчни култури беше установена чрез колориметричен метод за количествено отчитане на алкално-фосфатазна активност и чрез специфично хистологично оцветяване за доказване отлагането на  $\text{Ca}^{2+}$  кристали в екстрацелуларния матрикс. В края на стимулационния период беше установена повишена алкално-фосфатазна активност на клетките (Фиг. 23 А.) в сравнение със съответни контролни клетъчни култури. Наличието на  $\text{Ca}^{2+}$  кристали беше доказано чрез оцветяване по von Kossa и чрез ализарин ред. (Фиг. 24 А. и Б.)

При същата серия от експерименти проведени с ГБМ клетки култивирани по класическия метод за получаване на АК също беше установена повишена алкално-фосфатазна активност, като степента на тази активност беше съизмерима с тази, установена при клетъчните култури, отглеждани по нашия междинен метод. (Фиг. 23 Б.) Клетките растяха подобно на тези от нашия модел и дадоха подобно оцветяване (резултатите не са показани).

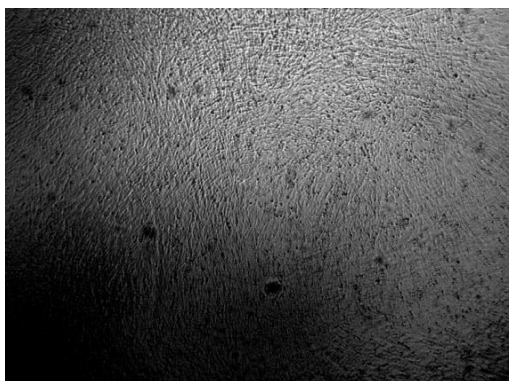


А.

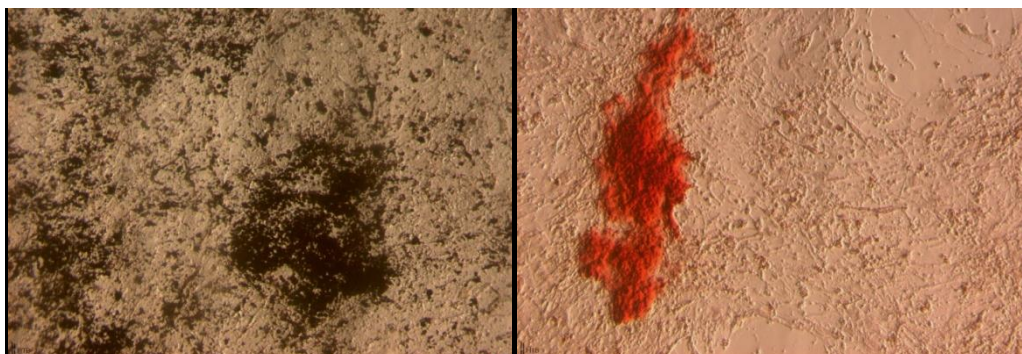


Б.

Фиг. 23 . Количествено отчитане на степента на остеогенна диференциация при ГБМ клетъчни култури чрез тест за алкално-фосфатазна активност. А. При клетъчни култури, култивирани по междинен модел; Б. При клетъчни култури, култивирани по класически метод за АК.



А.



Б.

В.

Фиг. 24 Остеогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ, отглеждани по междинен модел. А. Клетки култивирани в контролна среда; Б. Клетки култивирани в остеоиндуктивна среда, специфично оцветяване за остеогенна диференциация по von Kossa (черно оцветено  $\text{Ca}^{2+}$  отлагания); В. Специфично оцветяване за остеогенна диференциация с ализарин ред (червено оцветени  $\text{Ca}^{2+}$  отлагания).

Опитите за адипогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ бяха неуспешни. Клетките запазиха своята виталност в адипоиндуктивна среда, но не бяха установени, характерните за този тип диференциация, мастни капки в културите. (Фиг. 25)



Фиг. 25 Липса на адипогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ, отглеждани по наш междинен модел.

От резултатите получени при изследването на клетките изолирани от ГБМ и култивирани в среда с фактори и серум, според минималните изисквания на ISCT за

МСК може да обобщим, че клетъчните култури показаха прилики с последните и по-раните вече описани критерия. Те растат в монослой като прилепнали фибробластоподобни клетки, като проявят експресия на маркери, характерни за МСК. При над 90% от тях се наблюдаваше едновременна положителна експресия за маркерите – CD73, CD90, CD105, CD29 и CD146 и подобно на МСК беше отчетена експресия на HLA клас I (A,B,C). Клетките бяха отрицателни за експресия на CD34 и CD45. Важно е да се спомене, че култивирането като НС на клетки, изолирани от ГБМ не показаха експресия на тези маркери, но трансформираните НС до АК в среда със сыворотка показаха експресия на маркери много подобна на нашия модел. По отношение на третия критерий за трилинейна диференциация опитите ни върху изолираните от ГБМ клетки доведоха до успех при остеогенната диференциация, докато адипогенната се оказа неуспешна. Хондрогенна диференциация не беше тестирана. ГБМ клетъчните култури проявяват и свойство за самообновление, което също се смята за типично за мезенхимните стволови клетки и все още се възприема като „златен стандарт“ при определянето им.

Макар и малко, в научната литература са описани данни отнасящи се до експресията на маркери, характерни за МСК от ГБМ изолирани клетки. Tso et al. 2006 например съобщават, че клетъчни култури, отглеждани по класически метод за АК, от първичен ГБМ експресират CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и CD109, а показват липса на експресия на CD14, CD34 и CD31, подобно на МСК. Те установяват още, че тъкани от първичен ГБМ експресират CD105, докато този маркер липсва при вторичен ГБМ и нормална мозъчна тъкан. Nakahata et al. 2011 доказват, че АК от ГБМ експресират CD29, CD44, CD166, CD90, CD105 и CD73, а липсва експресия на CD45, CD133, CD14, HLA-DR и CD31. Те успяват да диференцират клетъчните култури до остеоцити, хондроцити и адипоцити, а също доказват, че са туморогенни. Tomuleasa et al. 2010 в изследването си върху изолирани от ГБМ клетки, формиращи НС съобщават, че тези клетки експресират CD90 и CD105, като за CD90 дори се твърди, че се експресира специфично от ГБМ, изолирани ТСК, но не и от НСК. (Woo et al. 2015) Експресията на CD73 от ГБМ и ГБМ клетъчни култури се свързва с тяхната пролиферация, като се смята, че този фактор участва в регулацията на процесите на клетъчен растеж, диференциация, инвазия, миграция и метастазиране. (Bavaresco et al. 2008)

## 5.10. Секреция на цитокини при ГБМ клетъчни култури

Възможността култивираните от нас клетки, изолирани от ГБМ да секретират фактори, насочващи имунните клетки към толеранс ни подтикнаха да изследваме цитокиновата им секреция. В научната литература, посветена на ГБМ, има голямо количество данни, които сочат, че този тумор действа чрез разтворими фактори и води до супресия на ИС, както на локално, така и на системно ниво. За да потвърдим тези данни, беше направен цитокинов профил на културите от ГБМ. Замразените на  $-70^{\circ}\text{C}$  супернатанти от 16 ГБМ клетъчни култури, култивирани по наш модел и от 10 глиобластоми, култивирани като невросфери бяха тествани за наличие на следните 13 цитокина: IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-18, IL-23, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ 1, sPECAM и sICAM. От всички изследвани цитокини, както при култивираните като междинен модел, така и при невросферите беше установена секреция за IL-6 и IL-8. Единствено при невросферите беше установена и слаба секреция на IL-10. Клетките, култивирани по междинен модел бяха изследвани и за матриксните металопротеинази MMP7 и MMP10, като положителна експресия беше установена само за MMP10. Резултатите от средните стойности за цитокините са дадени в Таблица 4.

Таблица 4 Секреция на цитокини от ГБМ клетъчни култури.

Цитокин	IL-6		IL-8		MMP10		IL-10	
	АК-наш модел	НС	АК- наш модел	НС	АК- наш модел	НС	АК-наш модел	НС
Секреция в pg/ml	139,72	103,42	1696,8	2033,35	35,70	N/T	0	13,15

Супресията на клетъчно медиация имунитет, както на локално, така и на системно ниво, установена при пациенти с ГБМ се свързва с освобождаването на различни имunosупресивни фактори. (*Piperi et al. 2005*) Предполага се, че невъзможността на ИС да се справи с туморните клетки, може от части да се дължи на тумор-асоциираната цитокинова дисрегулация. (*Hao et al. 2002*) Както вече беше споменато IL-6 е цитокин с плейотропно действие, които има важна роля при протекцията на нервната система при инфекции, травматично мозъчно увреждане и исхемия и при патологията на възпалителния отговор. Повишени нива на IL-6 се свързват с хронични възпалителни

състояния, а при раково болни – с по-ниска преживяемост. (*Van Meir et al. 1990; Scheller et al. 2006; Samaras et al. 2007; Wang et al. 2009; Bromberg et al. 2009*) IL-6 регулира самообновяването на ТСК, чрез задействане на Stat3 от IL-6R/GP130 комплекса (*Sansone et al. 2007*), а Stat3 активацията на свой ред води до активация на NF- $\kappa$ B и секреция на допълнителни количества IL-6 и IL-8. При болни от рак на гърдата се наблюдава привличане на костномозъчни мезенхимни стволови клетки (КМ-МСК) по градиента на IL-6 и се смята, че този цитокин е ключов компонент в поддържането на туморната маса. (*Liu et al. 2011*) При ГБМ, секрецията на този цитокин е добре описана, като се смята, че той участва в ангиогенезата, клетъчната пролиферация, устойчивостта на апоптоза и радиация на тумора. (*Goswami et al. 1998; Weissenberger et al. 2004; Saidi et al. 2009; Reynes et al. 2011*) В съответствие с литературните данни, клетъчните култури, отглеждани като НС и по наш междинен модел показваха секреция на IL-6.

IL-8 е въввлечен в развитието на ГБМ чрез функциите си на хемоатрактант и промотор на ангиогенезата, а също е установено, че ГБМ клетъчни линии постоянно експресират IL-8 mRNA и секретират IL-8. (*Desbaillets et al. 1999; Salmaggi et al. 2003*) Секрецията на този цитокин се стимулира от IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6 и IL-17 и може би е един от ключовите фактори, водещи до лимфоидните инфилтрати, наблюдавани при ГБМ. (*Kehlen et al. 1999; Brat et al. 2005*) Предвид фактът, че при нашия модел и при НС е установена секреция на IL-6, може да се предположи, че той е един от факторите, предизвикващ секрецията на IL-8 по автокринен път при двата вида клетъчни култури. Големите количества на секретиран IL-8 предполагат активното му участие в процесите на пролиферация и самообновление при двата вида клетъчни култури. В организма IL-8 осъществява своето действие чрез инхибиране на апоптозата на ендотелни клетки и индукция на продукцията на матриксни металопроотеинази (MMPs), които са необходими за ангиогенезата. (*Li et al. 2003*) Една от най-слабо изследваните MMPs е MMP-10. Изследвания върху рак на маточната шийка и на пикочния мехур показват, че тази металопроотеиназа може да регулира миграцията, инвазията и формирането на съдове от ендотелните клетки, като тези ефекти са свързани и с устойчивост на апоптоза. (*Zhang et al. 2014*) При клетъчна линия от белодробен карцином е установена пряка връзка между IL-6 и секрецията на MMP-10, която се осъществява чрез Jak2 – Stat3 пътя. (*Zhang et al. 2009*) Като се вземе предвид участието на тази металопроотеиназа при други тумори, може да се предположи, че тя има участие

в туморните растеж, инвазия и ангиогенеза и при ГБМ. Необходими са, обаче, допълнителни изследвания, за да се потвърди това предположение.

Следвайки аналогията между нашите култивирани клетки и МСК, е важно да се отбележи, че мезенхимните стволови клетки постоянно секретират големи количества от IL-6 и IL-8. (Kyurkchiev et al. 2014) Все повече данни сочат, че МСК са важни участници в постнаталната васкулогенеза, особено в случаите на тъканна исхемия и туморна васкуларизация. Установено е, че IL-8, отделен от исхемична мозъчна тъкан участва в процеса на привличане на МСК, а също засилва потенциала им за ангиогенеза. (Ball et al. 2007; Hou et al. 2014) За IL-6 също е установено участието му при привличане на МСК при малигнени заболявания. (Liu et al. 2011). Предвид изказаното предположение, че в микросредата на ГБМ същесвуват няколко популации от стволови клетки и сходствата между МСК и някои характеристики на ГБМ (особено при клетъчни култури с адхерентен растеж) може да се спекулира, че ТСК при ГБМ, активно привличат субпопулация от МСК секретирани IL-6 и IL-8, или алтернативно се диференцират до такива. В подкрепа на тази хипотеза са данните на Paul et al. 2012 за наличие на МСК в нормална мозъчна тъкан, както и наскоро публикуваните данни от Hossain et al. 2015, които установяват тумор-асоциирани МСК, секретирани IL-6 и IL-8 при ГБМ.

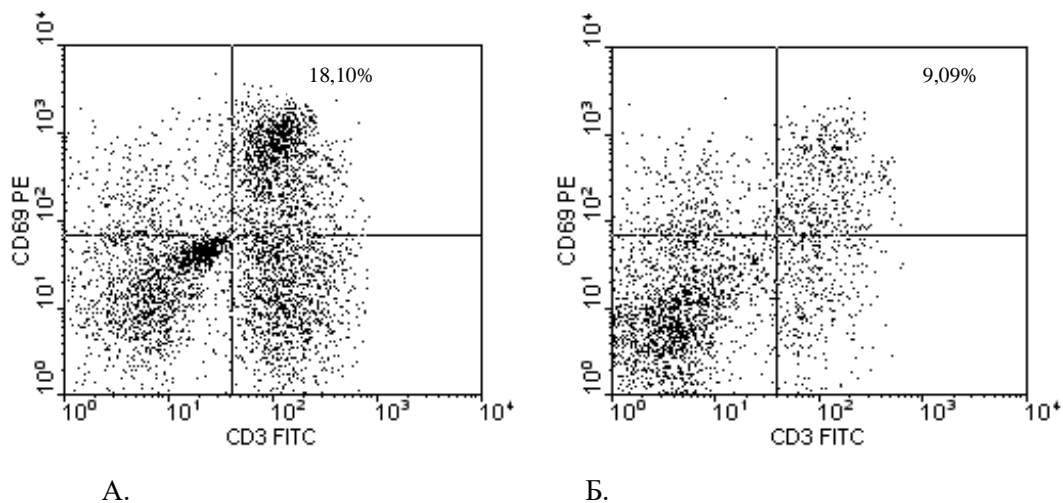
На базата на тези данни и на нашите резултати описващи, че както НС, смятани за истински ТСК, така и АК, проявяващи характеристики на МСК, секретират IL-6 и IL-8, може да предположим, че ТСК и тумор-асоциираните МСК чрез секрецията на тези цитокини, участват в процесите на набиране на нови МСК в туморното обкръжение, които да поддържат процесите на растеж и ангиогенеза, характерни за тумора.

### **5.11. Изследване на влиянието на супернатанта от ГБМ клетъчни култури върху активацията на РВМС**

Секрецията на цитокини, част от свойствата, които се свързват с обуславяне на имуноен толеранс ни даде основание да изследваме способността на нашите култивирани клетки да осъществяват функционална супресия, чрез секреторни фактори. За тази цел беше проведено изследване на влиянието, което оказва супернатанта от култивираните клетки върху активацията на Т-лимфоцитите. За целта бяха изолирани РВМС от

здравни донори, които бяха култивирани в супернатанта от ГБМ клетъчни култури за 60ч. Като контрола бяха използвани PBMCs от същите донори, поставени в среда за култивиране (DMEM с EGF, FGF и 10%FBS) при отсъствието на ГБМ клетки. След изминаването на времето на култивация PBMCs бяха стимулирани с фитохемаглутинин (PHA), който активира неспецифично Т-лимфоцитната популация от PBMCs и резултатите бяха отчетени чрез флоуцитометричен анализ. (Фиг. 26) Активацията на Т клетките беше доказана чрез експресията им на CD69 – класически ранен лимфоцитен активационен маркер.

Изследването показва, че при стимулиране с PHA на PBMCs, изолирани от здрави донори и третирани с контролна среда, се активира висок процент от Т-клетъчната популация. Средните стойности на индекса им на стимулация (ИС) беше 26.53, стойност близка до получената от нас при създаването на референтните граници за стимулиране на Т-клетки от периферна кръв на здрави лица. (Младенова и кол. 2013) За разлика от контролните клетки, Т-лимфоцитната субпопулация от PBMCs, престояли 60 часа в среда от ГБМ клетъчна култура, загубват способността си да се активират в пълна степен и индексът на стимулация е средно 13.18. На таблица 5 са представени индексите на стимулация на Т-лимфоцити, третирани със среда от съответната ГБМ култура в сравнение с третирани с контролна среда при 8 експеримента.

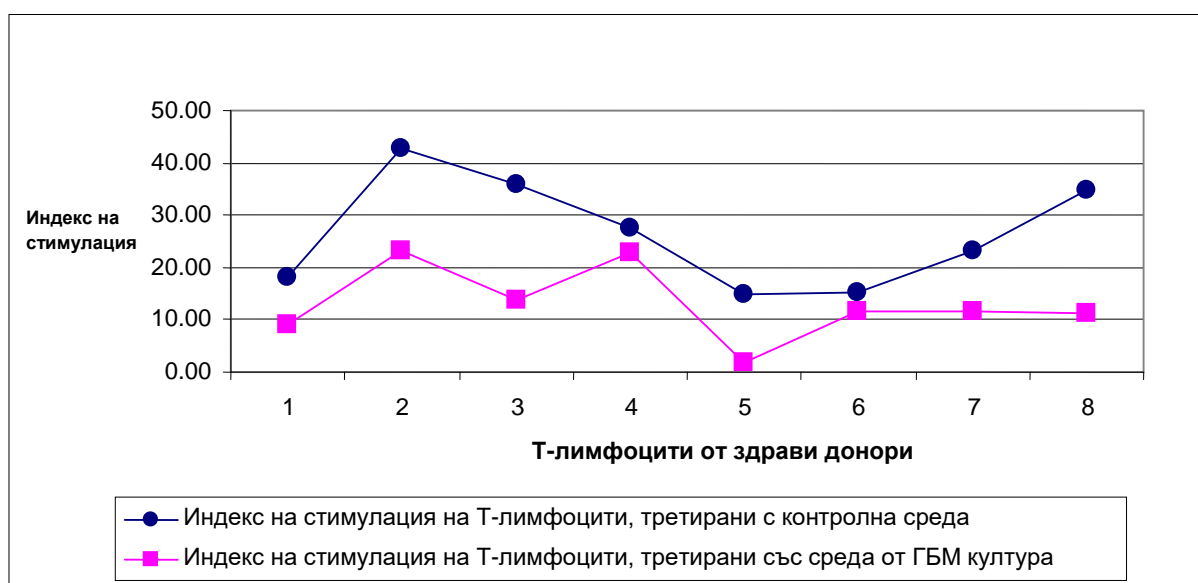


Фиг. 26 Флоуцитометрично отчитане на активацията на Т-лимфоцити. Отчетени са клетки, двойноположителни за CD3 и CD69. А. Двойно-положителни по CD3/CD69 Т лимфоцити, култивирани в контролна среда. Б. Двойно-положителни по CD3/CD69 Т лимфоцити, култивирани в среда от клетки, изолирани от ГБМ.

Таблица 5. Индекси на стимулация на Т-лимфоцити, съответно третиран с контролна среда и със среда от ГБМ култури. (Тумангелова-Юзеир и кол. 2015)

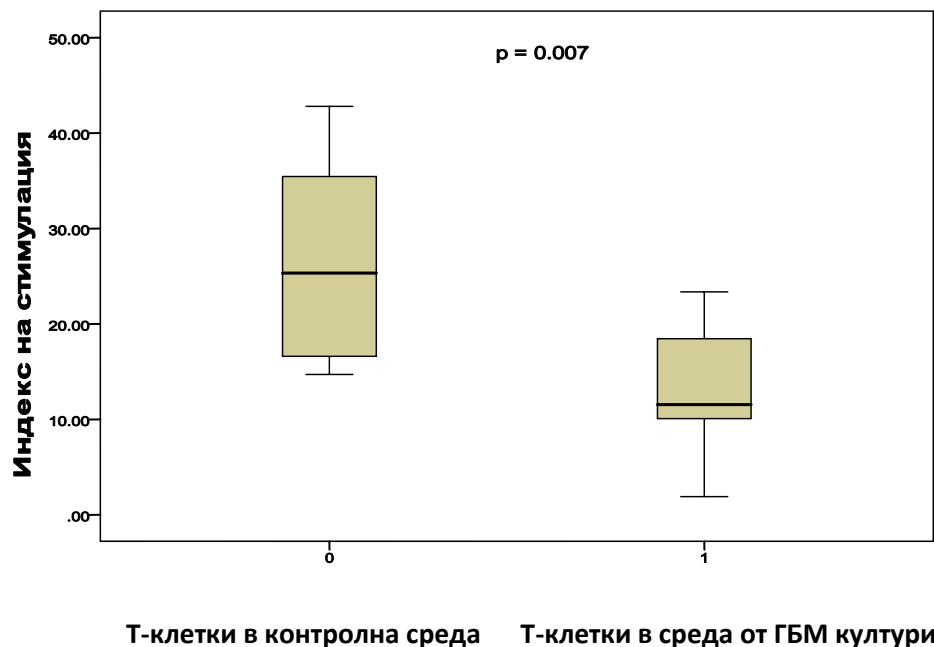
	Индекс на стимулация на Т-лимфоцити, третиран с контролна среда	Индекс на стимулация на Т-лимфоцити, третиран със среда от ГБМ култури
ГБМ 1/Здрав донор 1	18.10	9.09
ГБМ 2/Здрав донор 2	42.79	23.35
ГБМ 3/Здрав донор 3	36.00	13.90
ГБМ 4/Здрав донор 4	27.50	23.00
ГБМ 5/Здрав донор 5	14.70	1.90
ГБМ 6/Здрав донор 6	15.10	11.50
ГБМ 7/Здрав донор 7	23.15	11.60
ГБМ 8/Здрав донор 8	34.90	11.08
<b>Средна стойност на индекс на стимулация</b>	<b>26.53</b>	<b>13.18</b>

При обработка на данните се забелязва, че при някои донори Т-клетките, третиран с среда от ГБМ клетъчни култури и третиран с контролна среда имат близък индекс на стимулация (номер 4 и 6). Въпреки това, обаче, при всички изследвания по-ниски остават индексите на стимулация на Т-лимфоцитите, култивирани в среда от ГБМ култура (Фиг.27).



Фиг. 27 Индекси на стимулация на Т-клетки, получени от здрави донори и отбелязани като поредни числа, съответно третиран с контролна среда и третиран със среда от ГБМ култура. (Тумангелова-Юзеир и кол. 2015)

При сравняване на средните стойности на индекса на стимулация в групата на Т-лимфоцити, третирани с контролна среда и в групата на третирани със среда от ГБМ култивирани клетки, установихме статистически значима разлика между тях ( $p=0.007$ ). (Фиг.28)



Фиг. 28. Средни нива на индекса на стимулация на Т-лимфоцити, третирани със среда от ГБМ култивирани клетки и третирани с контролна среда. (Тумангелова-Юзеир и кол. 2015)

Съхранената супернатанта от PBMCs, култивирани в среда от ГБМ култури и в контролна среда изследвахме за наличие на IL-10 с идеята, че е вероятно под влияние на секреторни фактори от ГБМ клетките, част от Т лимфоцитите да се диференцират в Tregs, секретирани този цитокин. Това би могъл да бъде един от механизмите, чрез който се подтискат Т клетките. Резултатите ни, обаче не показаха разлика в нивата на IL-10 при PBMCs, култивирани в среда от ГБМ клетки и тези в контролна среда. Средната стойност на цитокина, установен при PBMCs, култивирани в среда от ГБМ беше 10,52 pg/ml, а в среда от контролни клетки - 8,97 pg/ml. При тестирането на лимфоцитите за експресия на FoxP3, също не се установиха разлики (данните не са показани). Предишни наши резултати, обратно показват, че култивирането на Т-хелпери в среда от мезенхимни стволови клетки води до формирането на Tregs, секретирани IL-10. (Ivanova-Todorova et al. 2012) Този резултат не беше получен при използването на среди от ГБМ клетки, което може да се дължи на разлика в опитните

постановки, но може да бъде и обективен факт. Подобно изследването провеждат *Zou et al. 1999*, които доказват, че моноцити, изолирани от здрави донори и поставени в супернатанта от глиоми не секретират увеличени количества IL-10, за разлика от моноцити на хора с ГБМ.

Изследването на влиянието на супернатанта от клетки изолирани от ГБМ и култивирани по наш метод върху способността за активация на Т-лимфоцити показва, че без съмнение клетките от ГБМ секретират фактор/и, които потискат Т-клетките. При ГБМ е установена секреция на имunosупресивни фактори с такова действие като TGF $\beta$ 1,2, IL-10, VEGF, PGE2 (*Elliott et al. 1992*), докато при МСК, факторите със супресивно действие върху Т клетъчната субпопалация са IDO, PGE2, HGF, CCL2, CCL5, HLA-G5. (*Kyurkchiev et al. 2014*) В супернатантите при клетките култивирани по наш междинен модел, ние не установяваме наличие на TGF $\beta$  и IL-10, като VEGF, PGE2, HGF, CCL2, CCL5, HLA- G5 и IDO не са изследвани.

Нашите данни показват наличие на цитокините IL-6, IL-8 и MMP-10, като за втория и третия няма данни да имат супресивен ефект върху Т-клетките. По друг начин стои въпросът с IL-6. За него има данни, че при ГБМ активира JAK-2, която на свой ред активира Stat3 в туморните клетки. Stat3 активацията води до тумор-секретирани фактори (като IL-6, IL-10, VEGF), които на свой ред активират Stat3 в различни имунни клетки, включително и в Т-клетките. Задвижва се механизъм, който поддържа постоянно активиран транскрипционния фактор, както в туморните, така и в имунните клетки. (*Yu et al. 2007; Wei et al. 2010*) *Wei et al. 2010* провеждат подобно на нашето изследване, но с НС, което показва, че супернатанта от клетъчните култури инхибира пролиферацията и секрецията на про-инфламаторни цитокини от Т-лимфоцитите, индуцира Tregs и предизвиква Т-клетъчна апоптоза. Изследването за цитокинова секреция на получените от тях НС показва липса на IL-6 и наличие на PGE2, TGF $\beta$ , VEGF, CCL-2 и Galektin-3. Те доказват, че супернатанта от НС предизвиква активация на Stat3 в Т-лимфоцити и че блокирането на Stat3 активацията чрез Stat3 siRNA в култивираните туморни клетки, намалява активацията на транскрипционния фактор в имунните клетки. Установено е, че активираният в ТСК Stat3 води до секреция на имunosупресивни фактори, които активират същия транскрипционен фактор в множество имунни клетки. (*Yu et al. 2007*) Клетките култивирани по наш междинен модел не са изследвани за експресия на Stat3, но фактът, че той е установен на срези от туморни материали при пациенти с ГБМ в предишно наше изследване, както и установената експресия на IL-6 в културелната среда, ни дава основание да

предположим, че култивираните по наш модел клетки също го експресират. Може да спекулираме, че наблюдаваната от нашия екип намалена активация на Т-лимфоцити се дължи на IL-6 и активацията на Stat3 в тях.

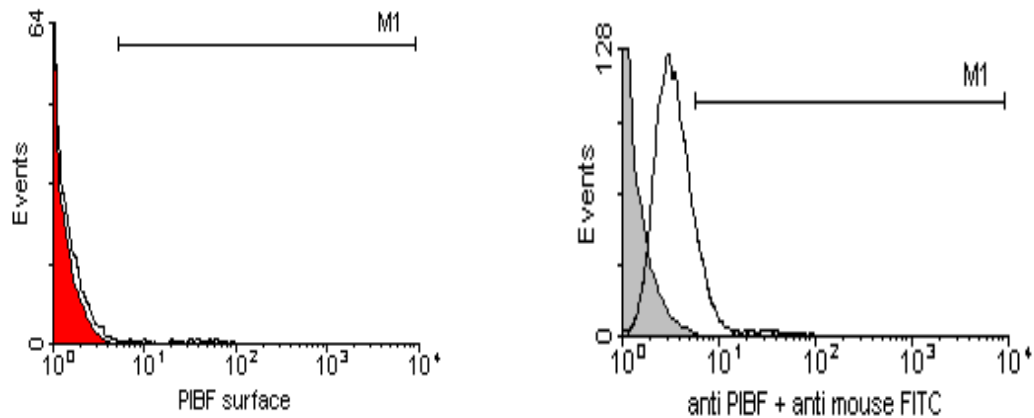
При МСК секрецията на IL-6 е отдавна установена, като ефектите от действието на този цитокин, а именно задействането на JAK-Stat3 сигналния път, се наблюдава, както при оздравителни, така и при малигнени процеси. (*Shabbir et al. 2010; Tu et al. 2012*) *Wang et al. 2007* съобщават за конститутивна експресия на Stat3 при МСК, на която се дължи секрецията на VEGF. При рак на гърдата има данни, че в условия на хипоксия туморните клетки секретират високи нива IL-6, който не само привлича МСК в туморната микросреда, но и активират Stat3 и MAPK сигнални пътища в тях. (*Rattigan et al. 2010*) ГБМ е солиден тумор, който също се характеризира с хипоксия, експресията на IL-6 от туморните клетки е добре описана и най-новите данни сочат, че той също активно привлича МСК в микросредата си. В този ред на мисли независимо какъв тип са култивираните от нас клетки - ТСК или МСК те биха могли да предизвикат супресия на Т-лимфоцитите по пътя на дъгата IL-6 – JAK-Stat3.

## 5.12. PIBF експресия в клетъчни култури от ГБМ

Освен чрез цитокини имунния отговор може да бъде модифициран и чрез специфични фактори един от които е известен като PIBF. PIBF е фактор добре описан при множество клетки, включително МСК и обуславя част от имуносупресивните клетъчни свойства. Въпреки, че е установен като експесиран под действието на прогестерон, днес има все повече доказателства, че той може да бъде експесиран и независимо от хормона под действието на други фактори. Поради голямото сходство на ГБМ клетъчните култури с МСК, PIBF беше изследван и при клетки култивирани от глиобластом по наш междинен модел. До сега липсваха съобщени данни за изследване на PIBF при ГБМ в научната литература. Този фактор беше изследван от нас по 3 различни метода – флоуцитометричен, конфокална микроскопия и qRT-PCR.

Изследването чрез флоуцитометрия беше проведено при 6 ГБМ клетъчни култури, като беше изследвана повърхностна и вътреклетъчна експресия на маркера. Изследването на повърхностна експресия на PIBF показва липса на този маркер, като отчетените стойности бяха средно 0,2% и бяха сходни с негативната контрола. При изследване на

вътреклетъчната експресия на маркера, обаче, бяха отчетени положителни клетки, които представляваха средно 7% от клетките в клетъчната култура. (Фиг.29)

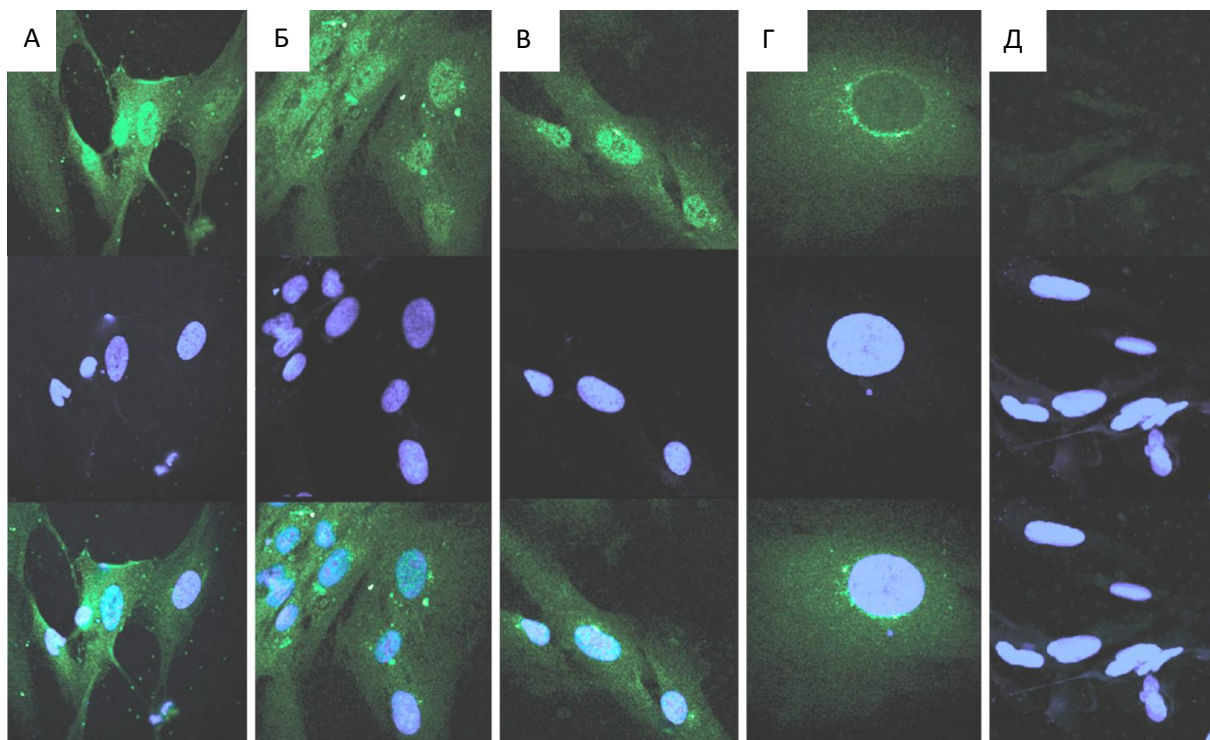


А.

Б.

Фиг. 29 Флоуцитометрично изследване на клетъчни култури от ГБМ (култивирани по наш междинен метод). А. Липса на повърхностна експресия на PIBF; Б. Положителна вътреклетъчна експресия на PIBF.

Изследването на клетъчните култури чрез имуноцитохимия и конфокална микроскопия показва, че част от клетките експресират PIBF, като той може да бъде с различни форми на ядрена или на цитоплазмена локализация. (Фиг. 30)



Фиг.30 Положителна експресия на P1BF в клетъчни култури от ГБМ (наш междинен модел). Специфичната флуоресценция се вижда в зелен цвят, тъй като второто анти-мише антитяло е белязано с Alexa Fluor 488. Ядрата са оцветени с Hoechst 33258 и се виждат в син цвят.: А. Хомогенно цитоплазмено и фино гранулирано ядрено оцветяване на P1BF (увеличение 400x); Б. Гранулирано цитоплазмено и точковидно перинуклеарно (увеличение 400x); В. Гранулирано ядрено оцветяване (увеличение 400x); Г. Перинуклеарно оцветяване (увеличение 630x); Д. Контролни клетки без добавено антитяло срещу P1BF (увеличение 400x).

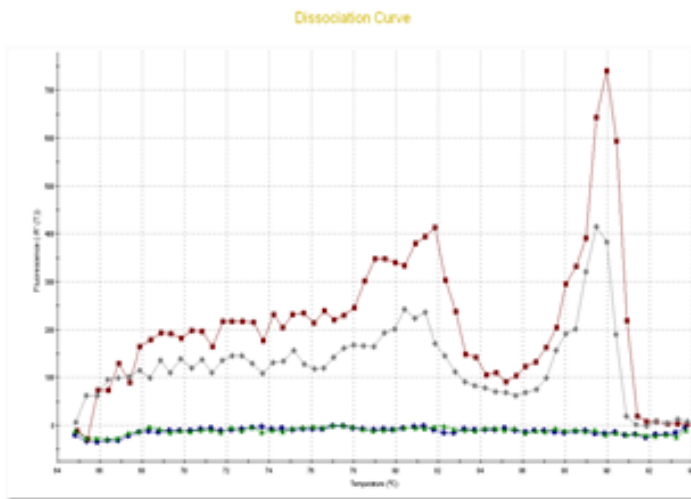
На Фиг. 30 А. се наблюдава хомогенно цитоплазмено с фино гранулирано ядрено оцветяване, докато на Фиг. 30 Б. – гранулирано цитоплазмено и точковидно околоядрено оцветяване. На Фиг. 30 В. и Г. са представени самостоятелна експресия на, съответно, гранулирано ядрено и перинуклеарно оцветяване. Различните типове на светене и различната локализация на P1BF в клетки от ГБМ клетъчни култури свидетелстват за активна роля на този фактор в клетъчните процеси, случващи се както в ядрото, така и в цитоплазмата.

Третият метод на изследване, който приложихме за установяване на P1BF в клетъчни култури от ГБМ е qRT-PCR. Установена беше експресия на фактора при всички, изследвани клетъчни култури, като за вътрешна контрола на изследването беше използван  $\beta$ -actin. Продуктите на реакцията бяха анализирани в агарозен гел, оцветен с етидиев бромид. (Фиг. 31 А. и Б.) Двата пика на дисоциационната крива могат да се обяснят с наличие на два продукта, резултат от алтернативен сплайсинг на изходната

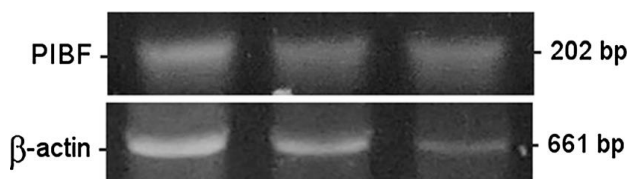
информационна РНК. В научната литература е известно, че РІВF съществува като няколко варианта с различна дължина в експресиращите го клетки.

## Dissociation Curve

*Glio 3&4 GPDH58C EvaGreen, 09-27-2013, 13Hr 08Min.mxp*



А.

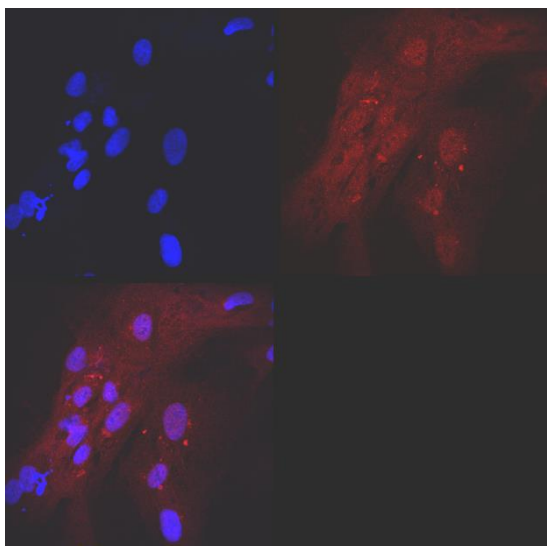


Б.

Фиг. 31 Изследване на експресия на РІВF при клетъчни култури от ГБМ чрез qRT-PCR. А. Дисоциационна крива показваща амплификация на кДНК при две от изследваните клетъчни култури. Б. PCR реакцията беше последвана от анализиране на продуктите в агарозен гел, оцветен с етидиев бромид, които показва експресия на матрични РНК, кодиращи РІВF в изходния материал.

Установяването на експресията на РІВF чрез три различни метода недвусмислено показва наличието на този фактор в клетъчни култури от ГБМ, култивирани по наш междинен метод.

РІВF беше установен и при клетъчни култури, отглеждани по класически метод за АК като изследването беше проведено чрез имуноцитохимия и конфокална микроскопия (Фиг. 32)



Фиг. 32 Изследване чрез конфокална микроскопия на експресия на PIBF при клетъчни култури, отглеждани по класически модел за получаване на АК. В червено е оцветено специфичното оцветяване, поради второ антитяло, маркирано с Alexa Fluor 594. Ядрата са оцветени в син цвят с Hoechst 33258.

От получените резултати може да се заключи, че при клетъчни култури с адхерентен растеж, независимо от средата, в която растат (само със 10% FBS или с EGF, bFGF и 10%FBS), част от клетките показват експресия на PIBF.

PIBF е белтък, който под действието на прогестерон при бременност осъществява имunosупресивен ефект чрез подтискане на NK-клетъчната цитотоксична активност, лимфоцитната цитотоксичност и насочване на имунния отговор (цитокиновата секреция) към Th2 тип, което благоприятства протичането на бременността. (*Check et al. 2009*) Експресия на PIBF е установена в бързо пролифериращи клетки и тъкани, като е установено, че той е един от асоциираните с центрозоми протеини, за които е известно, че свръхекспресията или мутацията им могат да доведат до туморогенеза. (*Lachmann et al. 2004*) Този фактор е установен при мезенхимни стволови клетки от различен произход (*Kyurkchiev et al. 2011; Kyurkchiev et al. 2013*), както и в редица туморни клетъчни линии (*Check et al. 2001; Check et al. 2007; Miko et al. 2011; Srivastava et al. 2007*) и солидни злокачествени тумори. (*Check et al. 2001; Lachmann et al. 2004*) Въпреки, че в ЦНС се секретира прогестерон, все повече доказателства сочат, че експресията на PIBF може да се индуцира и по механизми независими от хормона. (*Lachmann et al. 2004; Szekeres-Bartho and Polgar 2010*) Разбира се, наличието на този протеин в клетъчни култури, изолирани от ГБМ може да се дължи и на предварителното излагане на тези клетки на действието на прогестерона в ЦНС. Друг

факт, обясняващ участието на PIBF в малигнени процеси е локализацията на гена му в близост до гените, отговорни за предразположеност към рак на гърдата и туморната прогресия в 13-та хромозома. (*Check et al. 2010; Lachmann et al. 2004; Rozenblum et al. 2002; Szekeres-Bartho and Polgar 2010*)

От казаното до тук може да предположим, че PIBF е основен или един от основните фактори, осигуряващи растежа и развитието на ГБМ. Неговата способност да потиска НК и Т-клетъчната цитотоксичност и да насочва цитокиновата секреция към Th2 тип клетки, секретирани цитокини като IL-4, IL-6 и IL-10 (*Szekeres-Bartho and Wegman 1996*), напълно съответства на характерната за този тумор силна имуносупресия. Установено е, че при тумори PIBF може директно да регулира генната експресия на IL-6, EGF и Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), както и че води до късна Stat3 активация. (*Halasz et al. 2013*) При МСК, експресията на прогестеронови рецептори е добре описана (*Movagar et al. 2008; Han et al. 2008*), като се предполага че специално децидуалните МСК са алтернативен източник на  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитите за PIBF и че те представляват депо за този протеин. (*Kyurkchiev et al. 2011*)

Всичко казано до тук води до логичният извод, че експресията на PIBF от култивирани по наш модел клетки, изолирани от ГБМ е още една податка към хипотезата, че те представляват тумор-асоциирани МСК. Това не изключва възможността ТСК, като високо пролифериращи клетки също да експресират този белтък. Данни за експресията на PIBF от НСК и ТСК с доказана туморогенност, в литературата за сега липсват.

### **5.13. Култивирани по наш модел клетки, изолирани от ГБМ – ТСК или МСК?**

Както стана ясно култивирани от нас клетки на практика покриват критериите за мезенхимни стволови клетки, характеризирайки се със същата морфология, фенотип, способности за самообновление и мезенхимна диференциация, цитокинов профил и експресия на PIBF. Нещо повече, подобно на МСК, техни секреторни фактори са в състояние да подтиснат Т-клетъчната активация. Литературни данни също сочат, че МСК могат да бъдат отглеждани в среда с EGF и FGF, като и за двата фактора се твърди, че усилват техните растеж и пролиферация, без да влияят на

диференциационния им потенциал. (*Oreffo et al. 2005; Tamama et al. 2010; Portman-Lanz et al. 2010*) От друга страна, култивираните клетки безспорно притежават някои характеристики на ТСК, основни от които са способността за самообновление и експресията на маркерите: Nestin, Sox-2, GFAP, CD44. Факт обаче е, че самообновлението е обща черта за всички стволови клетки, а „НСК/ТСК” маркерите далеч не са рестриктирани само до този вид клетки.

По отношение на експресията на НСК/ТСК маркери от МСК е описано е, че МСК могат да експресират Nestin (*Vogel et al. 2003*), като този интермедиерен филамент се експресира още и от неврални и прогениторни клетки в ЦНС, както и от мускулни и миокардни прогенитори. Като цяло се счита, че Nestin се експресира от мултилинейни прогенитори с регенеративен потенциал. (*Wiese et al. 2004*) В литературата има данни и за експресия на Sox-2 от МСК, която се наблюдава при МСК с различен произход (костен мозък и мастна тъкан). (*Reza Izadpanah et al. 2006*) CD44 също се експресира от МСК, като участва в техния homing и е установен, както *in vivo*, така и от клетъчни култури. Има данни, че преди култивиране този маркер липсва върху повърхността на клетките, но културелните условия предизвикват експресията му. (*Bian et al. 2015; Quan et al. 2012*) *Foudah et al. 2014* публикуват изследване на експресията на невралните маркери Nestin, GFAP,  $\beta$ III-tubulin и NeuN от МСК, изолирани от различни източници (от мастна тъкан, кожа, периодонтален лигамент и дентална пулпа). Резултатите им показват експресия на  $\beta$ III-tubulin и NeuN от всички култури, докато Nestin и GFAP се експресират само от МСК, изолирани от мастна тъкан и кожа. При експресията на GFAP се наблюдава интересен феномен – МСК започват да го експресират след няколко пасажа на култивиране. *Tondreau et al. 2004* също съобщават, че при култивиране МСК експресират само Nestin и Tuj-I, докато след пети пасаж те вече могат да експресират протеини, характерни за по-диференцирани невронални/глиални клетки като GFAP. Данните за CD133 сочат, че МСК стопират експресията на този фактор. През 2009 *Mabuchi et al.*, обаче изследват експресията на CD133 от МСК, изолирани от костен мозък. Те установяват експресията му в над 20% от клетките. В допълнение те доказват, че една малка популация от двойноположителни по CD133 и CD271 клетки (0,75%) съдържа по-голямата част от клетките способни на самообновление. МСК положителни за CD133 са изолирани и от периферна кръв. (*Nichols et al. 2013*)

В допълнение на експресията на маркери, характерни за НСК/ТСК от МСК може да се споменат и множеството изследвания върху животински модели и хора, които описват,

че МСК са способни на неврална трансдиференциация. (*Deng et al. 2001; Kohyama et al. 2001; Sanchez-Ramos 2000*). Приликите и разликите в типа растеж при клетъчно култивиране, експресията на маркери, диференциацията и свойството клоногенност при ТСК и МСК по литературни данни и резултатите, получени от изследванията ни са онагледени в таблица 6.

Таблица 6 Експресия на маркери, характерни за ТСК и МСК, клетъчна диференциация и клоногенност при ТСК, култивирани по различен начин и при МСК. Легенда: ++ силна експресия или изява, + слаба експресия или изява, - липса на експресия или изява, +/- данните за са разнопосочни; \* нетестирано

	Растеж	Маркери за ТСК	Маркери за МСК	Диференциация	Клоногенност
ТСК	-адхерентен	GFAP++ CD44++ Nestin + Sox-2 + CD133 -	CD73++ CD90++ CD105++	остеогенна+ хондрогенна+ адипогенна+ неврални линии+	Да
	-НС	GFAP+/- CD44++ Nestin++ Sox-2++ CD133++	CD73+/- CD90+/- CD105+/-	Остеогенна* Хондрогенна* Адипогенна* неврални линии++	Да
МСК	- адхерентен	GFAP+/- CD44++ Nestin +/- Sox-2++ CD133+/-	CD73++ CD90++ CD105++	остеогенна++ хондрогенна++ адипогенна++ неврални линии +/-	Да
Наш междинен модел	-адхерентен -семи-адхерентен	GFAP++ CD44++ Nestin++ Sox-2++ CD133 +/-	CD73++ CD90++ CD105++	остеогенна++ хондрогенна* адипогенна* неврални линии*	Да

От изложеното до тук се вижда, че както данните от научната литература, така и нашите данни не могат да поставят ясни граници между двата типа клетъчни култури – МСК и ТСК, растящи като адхерентни клетки в съответната среда. Опитите да се обясни експресията на маркери, характерни за НСК/ТСК от МСК водят до предложението, че това се дължи на трансдиференциация на МСК в неврална посока. Различни изследвания, описват фактори, като EGF, BDNF (brain derived neurotrophic factor), невротропин-3 и 5-азидитидин, водещи до индукция на маркери на неврална диференциация. (*Sanchez-Ramos 2000*) Описано е обаче, че до същия ефект водят и

множество детергенти, високо рН, високомолекуларен NaCl, редуциращи агенти, антиоксиданти, както и култивиране върху различни повърхности. (Lu et al. 2004; Qian et al. 2004; Krabe et al. 2005; Phinney et al. 2005; Chen et al. 2006) Установено е, че тези агенти имат бързо действие, но и предизвиканият процес е лесно обратим. Подобен механизъм е установен и при фибробласти и кератиноцити. Генетичен анализ на МСК с предполагаема неврална трансдиференциация показва, че те са много различни, както от нормалната нервна тъкан, така и от нетретираните МСК. (Phinney et al. 2007) През 2005 Cho et al. изследват функционалните качества на получените чрез „трансдиференциация“ на МСК неврони, като установяват слаба мембранна деполяризация и непълноценна невротрансмисия. Всички тези данни по-скоро подкрепят тезата, че не се осъществява пълноценна трансдиференциация на МСК в неврална тъкан. По скоро се дискутира тезата, че при определени условия, МСК осъществяват процес на цитоскелетна реорганизация, свързана с нарушени биохимични свойства на микротубулите и микрофиламентната мрежа. (Chou et al. 2000)

Докато по отношение на МСК и тяхната експресия на „невронални“ маркери и трансдиференциация в неврални клетки е постигната някаква яснота и относителен консенсус в научните среди, то по отношение на ТСК, произлизащи, както се смята от НСК и техни прекурсори все още стоят множество въпроси. От таблица 3 е видно, че ТСК, растящи като АК, а според някои автори и като НС (Tomuleasa et al. 2010) проявяват експресия на маркери, характеризиращи МСК, според минималните критерии на ISCT. Няколко изследователски групи, преди нас описват прилика на клетки, изолирани от ГБМ с адхерентен растеж с МСК. Nakahata et al. 2011 изследват синтезираната ГБМ човешка клетъчна линия U87MG, описват проява на мезенхимен фенотип и на някои МСК характеристики от клетките ѝ. Те установяват експресията на CD44, CD73, CD90, CD105 и CD29, както и способност за адипогенна, хондрогенна и остеогенна диференциация. Едновременно с това тази клетъчна линия е способна да формира интракраниални тумори при плъхове. Подобни резултати съобщават Tso et al. 2006.

Допълнителни въпроси предизвиква и отчетената положителна експресия на Stat1 от клетъчните култури, отглеждани по наш междинен модел, на фона на отрицателната експресия, отчетена при изследване на туморен материал чрез имунохистохимия. Установено е, че този транскрипционен фактор се активира при МСК вследствие на IFN $\gamma$  сигнални процеси и кооперира с много цитокини за регулация на генната експресия. (Torreggiani et al. 2012)

Резултатите, получени от нашият екип, при изследването на ГБМ изолирани клетки, култивирани с FGF, EGF и серум показаха голяма прилика с МСК по отношение на морфология, фенотип, свойство за самообновление и остеогенна диференциация, както и някои допълнителни критерии (наличие на PIVF, Stat1 експресия и супресивно действие на секреторни фактори върху Т-клетките). Вземайки предвид и фактът, че при МСК също е доказана експресия на маркери, характерни за НСК/ТСК, както и че те се развиват в среда с EGF и bFGF и са описани в туморното обкръжение при ГБМ, то може да спекулираме, че тези клетки са именно мезенхимни стволови клетки. Естествено остават и въпроси, които до момента са неизяснени и които могат да повлияят на това твърдение, като например: Защо опитите ни за адипогенна диференциация се оказаха неуспешни? Дали клетките са способни на хондрогенна и неврална диференциация? Имат ли туморогенни свойства? Неизяснен остава и въпросът на какво се дължи фактът, че НС трансформирани до АК не успяха да възвърнат първоначалната си форма на растеж след премахването на серума от културелната среда - на наличие на два вида стволови клетки в изходните култури или на диференциация на изходните клетки?

Нашите резултати и изследванията проведени от *Tso et al. 2006* и *Nakahata et al. 2011* поставят въпроси, отнасящи се до типа на клетъчните култури, изолирани от ГБМ и смятани за ТСК. Нарастващ брой изследвания в научната литература твърдят, че МСК населяват ЦНС и туморното обкръжение, като се търси тяхната роля в генезата и прогресията на тумора. (*Paul et al. 2012; Appaix et al. 2014*) Логичният въпрос, който може да се зададе в случая е: Изолираните от ГБМ стволови клетки представляват ли ТСК, изменени под влияние на тумора МСК ли са, или са хетерогенна популация от стволови клетки? Известна яснота по въпроса хвърля изследването на *Hossain et al. 2015*, които твърдят, че съществуват глиома-асоциирани човешки МСК, които са не-туморогенни и фенотипно се доближават до костно-мозъчните МСК. На база геномен анализ на изолираните глиома-асоциирани МСК те съобщават, че около 60% от МСК се привличат от тумора, докато 10% могат да възникнат директно от ТСК. Останалите МСК проявяват генетична структура междинна по отношение на другите два типа. Глиома-асоциираните МСК повишават пролиферацията и самообновлението на ТСК *in vitro* и туморогенността и мезенхималните характеристики на ТСК *in vivo*. Авторите установяват, че тези ефекти на МСК са медиирани от секретираният от тях IL-6, който чрез gp130 води до активация на Stat3 в ТСК. Въпреки тези открития, все още има много неясноти относно ТСК и МСК изолирани от ГБМ, като фактът, че туморогенни

клетъчни култури проявяват свойства на МСК. Един логичен отговор на този въпрос би могъл да е предположението от нас наличие на поне два типа стволови клетки в клетъчни култури, изолирани от ГБМ. Едно интересно изследване в тази насока е проведено от *Cui et al. 2014* при плъши модели. Те показват, че МСК могат да претърпят малигнена трансформация в туморна микросреда, в която присъстват големи количества ИЛ-6. След индиректно ко-култивиране с С6 глиомна клетъчна линия почти всички МСК проявяват фенотип на малигнени клетки, формират тумори в nude мишки, повишават секрецията си на ИЛ-6, както и експресията на Stat3 и фосфолириран Stat3. Подобни резултати групата наблюдава и при третиране на МСК само с ИЛ-6.

От изложеното в научната литература, от получените от нашият екип резултати и следвайки предположението, че клетките изолирани от ГБМ и култивирани по наш модел са тумор-асоциирани МСК, предлагаме следната схема на взаимодействие между различните фактори, секретирани и експресирани в туморната микросреда. Естествено трябва да бъде направена уговорката, че част от даните са получени при култивиране на клетки, изолирани от ГБМ и може би не отразяват цялото многообразие на туморната микросреда *in vivo*. (Фиг. 33)



Автокринното действие на IL-6 и на P1BF върху МСК също активират транскрипционния фактор Stat3. Отделените в микросредата на тумора IL-6 и P1BF предизвикват супресия на имунните клетки и формиране на толерогенни ДК с липса на експресия на ко-стимулаторния комплекс В7. Секретираният от ТСК и променените МСК IL-6, наред с многото си функции, води и до формирането на толерогенен тип АПК с липсваща В7 експресия, които от своя страна обуславят анергия в Т клетките (Park et al. 2004)

Наред с описаната каскада, ТСК секретират и други фактори, потискащи клетките на ИС като IL-10. Описаният модел най-вероятно е само един от пътищата на регулация, които ГБМ използва, за да осигури растежа и устойчивостта си срещу действието на имунната система.

## 6. Заключение.

ГБМ е тумор, който предизвиква огромен интерес в научните среди, поради хетерогенния си строеж, сложните механизми, които участват в неговия растеж и устойчивост и фактът, че до сега не е открита успешна терапия за борба с него. Един от механизмите, използвани от злокачествените тумори, в това число и от ГБМ е модифицирането на фактори на имунната система, така, че те да не доведат до ефективен имунен отговор. Нашите изследвания потвърждават данните от научната литература, че ефекторните клетки на имунната система (Т лимфоцити и НК клетки) присъстват в микросредата на ГБМ, но вероятно са в супресивно състояние, като една от причините вероятно е липсата на експресия на костимулаторни молекули от локалните АПК (дендритни клетки, микроглия/макрофаги, астроцити). Антиген-представящи клетки с липсваща експресия на В7 се наблюдават по-скоро в центъра на туморната формация – мястото на интензивен имунен отговор.

Според модерните концепции за патогенеза на ГБМ основен момент се явява трансформирането на нормалните за ЦНС неврални стволови клетки в туморни стволови клетки. С цел да изследваме по-задълбочено смятаните за родоначални на ГБМ туморни стволови клетки, нашият екип създаде нов модел за култивирането на последните, съчетавайки условията за култивиране в двата класически модела – невросфери и адхерентни клетки. Разбира се, беше отчетен фактът, че клетъчните култури не отразяват многообразието на тумора *in vivo*. Отглежданите по новият модел клетки растяха като прилепнали фибробластоподобни клетки, силно наподобяващи мезенхимни стволови клетки. Те показаха едновременна експресия, както на маркери, характерни за ТСК, така и на такива за МСК. Изследването на свойството самообновление, характерно, както за ТСК, така и за МСК, също беше отчетено при всички клетъчни култури. По отношение на транскрипционните фактори беше изследван Stat1 и беше отчетена положителната му експресия, която е съобщена и при МСК. Едно важно откритие, което нашият екип направи е експресията на P1BF от клетките, отглеждани по нашия модел. Експресията на този фактор е доказана при МСК и до сега няма данни да е откривана при ГБМ или ГБМ клетъчни култури. Изследването на цитокиновата секреция на култивираните по наш междинен модел клетки показва наличие на IL-6, IL-8 и MMP-10. Двата цитокина са установени, отново и при МСК. MMP-10 все още е слабо изследван, но има данни за участието му в

малигнени процеси. Нашият екип проведе и някои изследвания върху клетки, изолирани от ГБМ и култивирани като невросфери. Отчетохме няколко разлики между нашия модел на култивиране и класическия на невросферите. НС показват по-ниска експресия на Sox-2 и CD44 в сравнение с резултатите отчетени при нашия модел и всички изследвани култури показват макар и ниска експресия на CD133. Клетките култивирани като НС секретират освен IL-6 и IL-8, и IL-10. При добавяне на серум клетките прилепват към дъното на плаката подобно на АК. Процесът е необратим и клетките запазват фибробластоподобна форма и растеж в монослой при премахване на серума от средата.

Наличието на клетки с характеристики, както на ТСК, така и на МСК в клетъчни култури в разработения от нас модел води до въпроса, какви са те всъщност. На този въпрос все още не може да бъде даден окончателен отговор. На този етап от нашите изследвания ние не можем да твърдим категорично, че клетките ни са туморни стволови клетки, поради липсата на данни за тяхната туморогенност, както и за генетичните мутации, типични за ГБМ. По отношение вероятността изследваните клетки да са МСК, получените от нас данни ни водят по скоро до това убеждение, тъй като клетките покриват и надхвърлят всички изисквания за дефинирането на дадена клетъчна популация като мезенхимни стволови клетки. Наличието на маркери за неврални ТСК (Nestin, GFAP) би могло да е израз, както на трансдиференциация на МСК в неврална посока под действието на EGF и bFGF налични в културата, така и на цитоскелетна дезорганизация под влияние на културалната среда. Какъв е произходът на тези клетки и съществуват ли реално в микросредата на тумора все още е въпрос, който подлежи на уточняване.

Има предположение, че мезенхимни стволови клетки произхождат от туморните клетки, като израз на частична диференциация, привличат се активно от тумора, а най-вероятно се осъществяват и двата процеса. Тази хипотеза е все още съвсем нова и тепърва предстои нейното утвърждаване и изясняване. За да твърдим убедено, че култивираните по наш модел клетки са МСК, трябва да бъдат проведени изследвания изясняващи няколко въпроса: 1) Какви са популациите от стволови клетки, участващи във формирането на невросферите, 2) До какво води добавянето на серум към културалната среда – до трансформация на ТСК в подобни на МСК клетки или до развитие само на един вид стволово-клетъчна популация? 3) Експресира ли се PIVF от ТСК с доказана туморогенност? 4) Туморогенни ли са отглежданите по наш модел

клетки? Възможно ли е при хора под действието на големи количества IL-6 МСК да придобият характеристики на ТСК, подобно на описано от *Cui et al. 2014*?

Каквато и да е клетъчната характеристика на култивираните клетки, във всички случаи секреторни фактори отделяни от тях са в състояние да потиснат Т-лимфоцитната активация – основен момент в антитуморното действие срещу имунната система. Данните от научната литература сочат, че един от тези секреторни фактори може да бъде IL-6, който нашите и други резултати доказват, че се секретира, както от глиобластомните клетки, така и от мезенхимните стволови клетки *in vitro*.

Даваме си сметка, че постигнатите резултати в по-голяма степен задават въпроси, отколкото дават отговори, което е логично когато човек работи в сферата на туморната имунология. Аз вярвам, обаче, че това е начинът водещ до опознаване на един толкова хетерогенен и устойчив на лечение тумор и до характеризиране на процесите случващи се в микросредата му, който би довел до успех в борбата с това заболяване.

## 7. Изводи

1. В туморната маса от ГБМ беше установена инфилтрация от Т-лимфоцити, НК-клетки и АПК, като беше установена и липса на ко-стимулаторния комплекс В7 при АПК.
2. ГБМ срези показват наличие на фосфорилиран Stat3 при голям процент от клетките в туморната маса.
3. Успешно бяха култивирани клетки, изолирани от ГБМ по двата класически методи – АК и НС
4. Създаден беше нов модел на култивиране на клетки от ГБМ.
5. беше установено, че клетки, растящи като НС при добавяне на серум прилепват към дъното на плаката и формират монослой, докато обратният процес не се установи.
6. При клетки, изолирани и култивирани от ГБМ беше установена експресия на маркери, характерни за НСК/ТСК
7. Установено беше свойството самообновление за култивираните по наш междинен модел ГБМ .
8. Установена беше експресия на Stat1 при клетки култивирани по наш междинен модел.
9. Изследването на секрецията на НС и на наш междинен модел показва наличие на IL-6, IL-8 и IL-10 и MMP10.
10. Установено беше, че клетки култивирани по наш междинен модел експресират маркери характерни за МСК, докато такива липсват при клетки, култивирани като НС.
11. Установено беше, че клетки култивирани по наш междинен модел успешно претърпяват остеогенна диференциация, но не успяват да се диференцират до адипоцити.

12. При клетки, култивирани по наш междинен модел и по класически модел за АК, беше установена експресия на PIBF.
13. Беше установено, че супернатанта от клетки, отглеждани по наш междинен модел успешно потиска активацията на Т-лимфоцити, изолирани от здрави донори.

## 8. Приноси

### 8.1. Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена беше инфилтрация от Т- лимфоцити, НК-клетки и АПК), както и липсата на ко-стимулаторен комплекс В7 върху АПК в туморната маса на ГБМ.
2. Потвърдена беше възможността клетки, изолирани от ГБМ, да бъдат култивирани по двата класически модела.
3. Потвърдена беше възможността НС да преминават в АК при добавяне на серум в културалната среда.
4. Потвърдена беше експресията на маркери, характерни за НСК/ТСК при ГБМ клетъчни култури, независимо от метода на култивиране.
5. Потвърдена беше секрецията на IL-6, IL-8 и IL-10 при клетки, култивирани като НС.
6. Установено беше, че клетки, изолирани от ГБМ, показват характеристики на МСК.

### 8.2. Приноси с оригинален характер

1. Създаден беше нов модел за култивиране на клетки, изолирани от ГБМ.
2. Клетките, изолирани от ГБМ и култивирани по новосъздаденият модел показваха експресия на маркери за НСК/ТСК маркери и способност за самообновление.

3. Установена беше секреция на IL-6, IL-8 и MMP10 при клетки култивирани по наш междинен модел.
4. Установена беше експресия на Stat1 при клетки култивирани по наш междинен модел.
5. Установено беше, че супернатанта от клетки, отглеждани по наш междинен модел успешно потиска активацията на Т-лимфоцити, изолирани от здрави донори.
6. За първи път в световната литература беше установена експресия на PIBF от култивирани клетки, изолирани от ГБМ

## 9. Публикации във връзка с дисертационния труд

1. Тумангелова-Юзеир К, Иванова-Тодорова Е, Кюркчиев Д (2013) Нелимфоидни имунорегулаторни клетки. Ревматология, 12-19.
2. Тумангелова-Юзеир К, Найденов Е, Иванова-Тодорова Е, Младенова Цв, Начев С, Мурджева М, Кюркчиев Д (2013) КЛЕТКИ ИЗОЛИРАНИ И КУЛТИВИРАНИ ОТ ГЛИОБЛАСТОМА МУЛТИФОРМЕ ИМАТ ПРИЛИКИ С МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ. БМЖ, 3: 56-60.
3. Kyurkchiev D, Naydenov E, Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Belemezova K, Bochev I, Minkin K, Mourdjeva M, Velikova T, Nachev S, Kyurkchiev S (2014) Cells Isolated from Human Glioblastoma Multiforme Express Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF). Cellular and Molecular Neurobiology, 34: 479-489.
4. Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Nachev S, Velikova T, Naydenov E, Kyurkchiev D (2014) Missing B7 in a part of antigen-presenting cells infiltrating glioblastoma multiforme Compt. Rend. Bulg. Sci, 67/7: 1005-1010.
5. Тумангелова-Юзеир К, Иванова-Тодорова Е, Великова Цв, Найденов Е, Начев С, Кюркчиев Д (2015) Периферни кръвни мононуклеарни клетки, изолирани от здрави хора, показват намалена способност за активация след култивиране със среда от клетъчни култури, получени от Глиобластома мултиформе, Годишник на Българска асоциация по клинична имунология 2014; 2015: 48-57.

## 10. Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд

1. Тумангелова-Юзеир К, Найденов Е, Иванова-Тодорова Е, Минкин К, Начев С, Кюркчиев С, Маринов М, Мурджева М, Кюркчиев Д Дендритни клетки и клетки при злокачествен глиобластом, Национална Конференция по Клинична Имунология, 25-26.04.2013г., гр.Стара Загора, презентация, стр. 18.
2. Тумангелова-Юзеир К, Иванова-Тодорова Е, Генчев М, Найденов Е, Романски К, Маринов М, Кюркчиев Д, Начев С Стволови клетки при глиобластом – значение за прогнозата. Невроморфологични и имунологични изследвания XI Национален Конгрес по Патология, 16-18.05.2013г., Гр. Шумен, постер- награда, П 25, стр. 54-55.
3. Tumangelova-Yuzeir K, Naydenov E, Ivanova-Todorova E, Belemezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev D Progesterone induced blocking factor was intracellular found in cell cultures derived from glioblastoma multiforme. 5-то Юго-източно, европейско училище по имунология (V-th South Eastern European Immunology School), 20-23.09.2013г., гр.София, постер.

4. Second International Neurooncology Academic Meeting, 24.10.2013г., гр. София (презентация)
5. Тумангелова-Юзеир К, Великова Ц, Иванова-Тодорова Е, Найденов Е, Генова М, Диков Т, Пенков М, Начев С, Кюркчиев Д Клиничен случай на индолентен В-дребноклетъчен лимфом в ЦНС, експресиращ маркери характерни за неврални стволови клетки., XV-та Юбилейна национална конференция за ОПЛ и Педиатри. 23-25.05.2014г., Слънчев Бряг, България, постер, стр.49.
6. Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Naydenov E, Nachev S, Kyurkchiev D Cells isolated from glioblastoma multiforme express markers typical for CSCs and secrete IL-6 and IL-8 Immune and stromal responses in cancerology: new challenges for therapeutic targeting., 8th edition of the workshop – 01-04. 10.2014, La Pointe de Pen Bron, La Turballe, France, Oral presentation, p.22
7. Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Naydenov E, Kyurkchiev S, Murdjeva M, Belemezova K, Nachev S, Kyurkchiev D New model of culturing of cells isolated from GBM. Detection of cancer stem cells markers, self renewal and cytokine secretion. Oral presentation, OP7.2, p. 100
- 4-ти Национален Конгрес по Имунология. 02-05. 10.2014г., Златни пясъци, Варна, България.
8. Tumangelova-Yuzeir K, Naydenov E, Nachev S, Genova M, Dikov T, Penkov M, Velikova T, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev D Comparison between cell cultures isolated from B-cell lymphoma and glioblastoma multiforme. poster, P23, p. 109
- 4-ти Национален Конгрес по Имунология. 02-05. 10.2014г., Златни пясъци, Варна, България.
9. Тумангелова-Юзеир К, Иванова-Тодорова Е, Великова Ц, Найденов Е, Начев С, Кюркчиев Д Периферни кръвни мононуклеарни клетки, изолирани от здрави хора, показват намалена способност за активация след култивиране със среда от клетъчни култури, получени от Glioblastoma multiforme. XI Национална конференция по медицинска биология, 15-17.05 2015 г., гр. Пловдив, България, постер.

## Библиография

1. Младенова Цв, Михайлова С, Спасова З, Кюркчиев Д, Михайлова А, Алтънкова И, Наумова Е (2013) Клиничен случай на пациент с общ вариабилен имунодефицит и гастроинтестинални прояви, Годишник на Българска асоциация по клинична имунология 2012., стр. 78-86.
2. Тумангелова-Юзеир К, Иванова-Тодорова Е, Великова Цв, Найденов Е, Начев С, Кюркчиев Д (2015) Периферни кръвни мононуклеарни клетки, изолирани от здрави хора, показват намалена способност за активация след култивиране със среда от клетъчни култури, получени от Глиобластома мултиформе, Годишник на Българска асоциация по клинична имунология 2014., стр. 48-57.
3. Abe BT, Macian F (2013) Uncovering the mechanisms that regulate tumor-induced T-cell anergy. OncoImmunology; 2:e22679.
4. Abou-Ghazal M, Yang DS, Qiao W, Reina-Ortiz C, Wei J, Kong L-Y, Fuller GN, Hiraoka N, Priebe W, Sawaya R, and Heimberger AB (2008) The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated-STAT3 expression in human gliomas. Clin. Cancer Res., 14(24), 8228–8235.
5. Aggarwal BB, Gehlot P (2009) Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? Curr Opin Pharmacol, 9: 351-369.
6. Agnihotri S, Munoz D, Zadeh G, Guha A (2011) Brain Tumor-initiating Cells and Cells of origin in glioblastoma. Translational Neuroscience, 2(4), 331-338.
7. Akira S (1999) Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice., Stem Cells, 17: 138-146.
8. Akiyama H, McGeer PL (1990) Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. J. Neuroimmunol., 30: 81–93.
9. Alaniz RC, Sandall S, Thomas EK, Wilson CB (2004) Increased dendritic cell numbers impair protective immunity to intracellular bacteria despite augmenting antigen-specific CD8+ T lymphocyte responses. J Immunol; 172:3725-3735.
10. Albesiano E, Han JE, and Lim M (2010) Mechanisms of local immunoresistance in glioma, Neurosurgery Clinics of North America, vol. 21, no. 1, pp. 17–29.
11. Alboni S, Cervia D, Sugama S, Conti B (2010) Interleukin 18 in the CNS. J Neuroinflammation, 7:9.
12. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, Nicholas R English NR, Knight SC, Carbone DP, and Gabrilovich DI (2001) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. J. Immunol. 166, 678–689.
13. Aloisi F, Ria F, Adorini L (2000) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes, Immunology Today, 21(3): 141–147.
14. Altinoz MA, Ozar E, Taskin M, Bozcali E et al. (2001) Vascularization pattern of c6 glioma is modified with medroxyprogesterone acetate and ibuprofen in Wistar rat brain., Pathology Oncology Research September, 7(3): 185-189.

15. Aroca F, Renaud W, Bartoli C, Bouvier-Labit C, Figarella-Branger D (1999) Expression of PECAM-1/CD31 Isoforms in Human Brain Gliomas *Journal of Neuro-Oncology*, 43 (1): 19-25.
16. Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jorgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merckenschlager M, et al. (2006) Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* 8, 532–538.
17. Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, Sharpless NE, Chan SS, You MJ, Tang Y, DeFrances J, Stover E, Weissleder R, Rowitch DH, Louis DN and DePinho RA (2002) Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: Convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell*, 1, 269-277.
18. Badie B and Schartner JM (2000) Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery*, vol. 46, no. 4, pp. 957–962.
19. Balsl J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C and von Deimling A (2008) Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica*, 116, 597-602.
20. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.
21. Bar EE, Lin A, Mahairaki V, Matsui W and Eberhart CG (2010) Hypoxia increases the expression of stemcell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *American Journal of Pathology*, 177, 1491-1502.
22. Barker CF, Billingham RE (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 25:1–54.
23. Bassi EJ, Aita CA and Camara NO (2011) Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? – *World J. Stem Cells*, 3, № 1, 1-8.
24. Beier D, Wischhusen J, Dietmaier W, Hau P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U and Beier CP (2008) CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. *Brain Pathol.* 18, 370–377.
25. Ben-Ami E, Berrih-Aknin S and Miller A (2011) Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. – *Autoimmun. Rev.*, 10, 410-415.
26. Bettelli E, Korn T and Kuchroo VK (2007) Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*, 19: 652-657.
27. Birner P, Toumangelova-Uzeir K, Natchev S, Guentchev M (2010) Stat3 tyrosine phosphorylation influences survival in GBM. *Journal of neuro-oncology*, 100(3): 339-343.
28. Black KL, Chen K, Becker DP, Merrill JE (1992) Inflammatory leukocytes associated with increased immunosuppression by glioblastoma. *J. Neurosurg.*, 77: 120–126.
29. Bleau AM, Howard BM, Taylor LA, Gursel D, Greenfield JP, Lim Tung HY, Holland EC, Boockvar JA (2008) New strategy for the analysis of phenotypic marker antigens in brain tumor-derived neurospheres in mice and humans. *Neurosurg. Focus*, 24, E28.
30. Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, de Tribolet N, Heid I, and Fontana A (1989) Immunosuppression and transforming growth factor beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor beta 2. *J. Immunol.*, 143:3222-3229.

31. Bonavia R, Inda M, Cavenee W and Furnari F (2011) Heterogeneity Maintenance in Glioblastoma: a social network. *Cancer Res.*, 71(12): 4055–4060.
32. Borish LC, Steinke JW (2003) 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111:S460–S475.
33. Bradbury MW, Cserr HF, Westrop RJ. Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *Am J Physiol* 1981; 240: F329-F336.
34. Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppes D et al. (2009) Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. *Cancer Science*, 100 (8): 1434–1442.
35. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG (2005) The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncol.* 7 122–133.
36. Bryant N, Suarez-Cuervo C, Gillespie GY, Markert JM, Nabors LB, Meleth S et al. (2009) Characterization and immunotherapeutic potential of  $\gamma\delta$  T-cells in patients with glioblastoma *NeuroOncology*, 11, 357–367.
37. Bromberg J, Wang TC (2009) Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell.*, 15:79-80.
38. Brooks WH, Latta RB, Mahaley MS, Roszman TL, Dudka L, and Skaggs C (1981) Immunobiology of primary intracranial tumors: Part 5: correlation of a lymphocyte index and clinical status. *J. Neurosurg.*, 54: 331-337.
39. Cattaneo E, and McKay R (1990) Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347, 762–765.
40. Buettner R, Mora LB, Jove R (2002) Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin. Cancer Res.*, 8: 945–954.
41. Burim RV, Teixeira SA, Colli BO, Peria FM et al. (2009) ICAM-1 (Lys469Glu) and PECAM-1 (Leu125Val) polymorphisms in diffuse astrocytomas. *Clinical and Experimental Medicine*, 9(2): 157-163.
42. Caballero O, de Souza S, Brentani R, Simpson A (2001) Alternative spliced transcripts as cancer markers. *Dis Markers*, 17:67–75.
43. Caldera V, Mellai M, Annovazzi L, Piazzini A, Lanotte M, Cassoni P and Schiffer D (2011) Antigenic and genotypic similarity between primary glioblastomas and their derived neurospheres. *Journal of Oncology*, Article ID 314962.
44. Carbone A, Rodeck U, Mauri FA, Sozzi M, Gaspari F, Smirne C, et al. (2005) Human pancreatic carcinoma cells secrete bioactive interleukin-18 after treatment with 5-fluorouracil: implications for anti-tumor immune response. *Cancer Biol Ther.*, 4(2):231 –41.
45. Carpentier AF and Meng Y (2006) Recent advances in immunotherapy for human glioma. *Curr.Opinion Oncol.* 18(6), 631 –636.
46. Carlsson A, Persson O, Ingvarsson J, Widegren B, Salford L, Borrebaeck CA, Wingren C (2010) Plasma proteome profiling reveals biomarker patterns associated with prognosis and therapy selection in glioblastoma multiforme patients, *Proteomics Clin. Appl.*, 4 591–602.
47. Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, and Ploix CC (2006) CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol. Rev.*, 213, 48–65.

48. Cassatela MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 178:2207-2211.
49. Castriconi R, Daga A, Dondero A, Zona G et al. (2009) NK Cells Recognize and Kill Human Glioblastoma Cells with Stem Cell-Like Properties. *The Journal of Immunology*, 182:3530–3539.
50. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL (2000) Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 14608-14613.
51. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, and Kettenmann H (2011) Th brain tumor microenvironment. *GLIA*, 59(8): 1169–1180.
52. Check JH, Nazari P, Goldberg J, Yuen W, Angotti D (2001) A model for potential tumor immunotherapy based on knowledge of immune mechanisms responsible for spontaneous abortion., *Medical Hypotheses*, 57(3):337–343.
53. Check JH, Sansoucie L, Chern J, Amadi N, Srivastava M, Larece K (2007) Evidence that progesterone receptor antagonists may help in the treatment of a variety of cancers by locally suppressing natural killer cell activity. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 34:207–211.
54. Check JH, Dix E, Sansoucie L (2009) Support for the hypothesis that successful immunotherapy of various cancers can be achieved by inhibiting a progesterone associated immunomodulatory protein. *Med Hypotheses*, 72:87–90.
55. Check JH, Sansoucie L, Chern J, Dix E (2010) Mifepristone treatment improves length and quality of survival of mice with spontaneous lung cancer. *Anticancer Res*, 30:119–122.
56. Chen WC, Lai YH, Chen HY, Guo HR et al. (2013) Interleukin-17- producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor., *Histopathology*, 63: 225-233.
57. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, Edgar KA, Wallin JJ, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, VandenBerg SR, Costello JF, Moorefield S, Cowdrey CJ, Prados M and Phillips HS (2010) A hierarchy of selfrenewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*, 17, 362-375.
58. Chen ML, Cao H, Chu YX, Cheng LZ, Liang LL, Zhang YQ, et al. (2012) Role of P2X7 receptor-mediated IL-18/IL-18R signaling in morphine tolerance: multiple glial-neuronal dialogues in the rat spinal cord. *J Pain*, 13(10):945–58.
59. Choi EA, Lei H, Maron DJ, Wilson JM et al. (2003) Stat1-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and the cell surface death signaling pathway by interferon beta in human cancer cells. *Cancer Res*, 63: 5299-5307.
60. Choi B, Archer GE, Mitchell DA, Heimberger AB, McLendon, Bigner DD and Sampson JH (2010) EGFRvIII-Targeted Vaccination Therapy of Malignant Glioma. *Brain Pathol.*, 19(4): 713–723.
61. Christofides A, Kosmopoulos M, Piperi C (2014) Pathophysiological mechanisms regulated by cytokines in gliomas. *Cytokine*, 71(2):377–84.
62. Cohen S (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem.*, 237:1555–62.

63. Cole SW (2009) Chronic inflammation and breast cancer recurrence. *J Clin Oncol*, 27: 3418-3419.
64. Coniglio SJ, Eugenin E, Dobrenis K et al. (2012) Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. *Molecular Medicine*, 18: 519–527.
65. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlasci V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, and Annunziato F (2003) Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood*, 102(12): 4107–4114.
66. Crende O, Sabatino M, Valcárcel M, Carrascal T, Riestra P, López-Guerrero JA, et al. (2013) Metastatic lesions with and without interleukin-18-dependent genes in advanced-stage melanoma patients. *Am J Pathol.*, 183(1):69–82.
67. Cserr HF, Knopf PM (1992) Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: A new view. *Immunol Today*, 13: 507-512.
68. Cuenca A, Cheng F, Wang H, Brayer J, Horna P, Gu L, et al. (2003) Extra-lymphatic solid tumor growth is not immunologically ignored and results in early induction of antigen-specific T-cell energy: dominant role of cross-tolerance to tumor antigens. *Cancer Res*, 63:9007-15.
69. Cui X, Xu Z, Zhao Z, Sui D et al. (2013) Analysis of CD137L and IL- 17 expression in tumor tissue as prognostic indicators for glioblastoma. *Int J Biol Sci*, 9: 134-141.
70. Cui X, Liu J, Bai L, Tian J, Zhu J (2014) Interleukin-6 induces malignant transformation of rat mesenchymal stem cells in association with enhanced signaling of signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Sci.*, 105(1):64-71.
71. Cullen DK, Simon CM, LaPlaca MC (2007) Strain rate-dependent induction of reactive astrogliosis and cell death in three-dimensional neuronal-astrocytic co-cultures, *Brain Research*, 1158: 103–15.
72. Curiel TJ, Barnett B, Kryczek I, Cheng P, and Zou W (2006) Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Cancer Immunol.*, 6(Suppl 1), 20.
73. Curtin JF, King GD, Candolfi M, Greeno RB, Kroeger KM, Lowenstein PR, Castro MG (2005) Combining cytotoxic and immune-mediated gene therapy to treat brain tumors, *Curr. Top. Med. Chem.*, 5, 1151–1170.
74. Darnell JE Jr, Kerr IM and Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins., *Science*, 264: 1415-1421,.
75. De Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, t Hart BA, Laman JD (2002) Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol*, 169: 5415-5423.
76. Degli-Esposti M and Smyth M (2005) Close encounters of different kinds: Dendritic cells and NK cells take centre stage, *Nature Reviews Immunology*, 5: 112-124.
77. Dai C, Celestino JC, Okada Y, Louis DN, Fuller GN and Holland EC (2001) PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes & Development*, 15: 1913-1925.

78. Deininger MH, Seid K, Engel S, Meyermann R, Schluesener HJ (2000) Allograft inflammatory factor-1 defines a distinct subset of infiltrating macrophages/microglial cells in rat and human gliomas. *Acta Neuropathol.*, 100: 673–680.
79. De la Iglesia N, Konopka G, Lim KL, Nutt CL et al. (2008) Deregulation of a STAT3-interleukin 8 signaling pathway promotes human glioblastoma cell proliferation and invasiveness., *J. Neurosci.*, 28: 5870–5878.
80. Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425:577–584.
81. Desbaillets I, Tada M, De Tribolet N, Diserens AC, Hamou MF, and Van Meir EG (1994) Human astrocytomas and glioblastomas express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in vivo and in vitro. *International Journal of Cancer*, 58(2): 240–247.
82. Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, van Meir EG (1999) Regulation of interleukin-8 expression by reduced oxygen pressure in human glioblastoma: Oncogene, 18(7): 1447-57.
83. De Simone R, Giampaolo A, Giometto B, Gallo P, Levi G, Peschle C, Aloisi F (1995) The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 54: 175–187.
84. Dhodapkar KM, Cirignano B, Chamian F, Zagzag D, Miller DC, Finlay JL, Steinman RM (2004) Invariant natural killer T cells are preserved in patients with glioma and exhibit antitumor lytic activity following dendritic cell-mediated expansion. *Int J Cancer*, 109:893–899
85. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F (2007) Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*, 25, 2025-2032.
86. Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noël D, Jorgensen C (2009) Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 5, 392-399.
87. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA (1991) Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation., *Cell*, 65:961–971.
88. Dimov I, Desanka Tasić-Dimov, Irena Conić and Vladisav Stefanovic (2010) Glioblastoma Multiforme Stem Cells. *TheScientificWorldJOURNAL*, 11, 930–958
89. Dinarello CA and Fantuzzi G (2003) Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis.*:187:S370–84.
90. Di Tomaso E, Capen D, Haskell A, Hart J et al. (2005) Mosaic tumor vessels: Cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res*, 65: 5740-5749.
91. Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, and Morford LA (1999) Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J. Neuroimmunol.*, 100(1–2), 216–232.
92. Duarte CW, Willey CD, Zhi D, Cui X et al. (2012) Expression Signature of IFN/STAT1 Signaling Genes Predicts Poor Survival Outcome in Glioblastoma Multiforme in a Subtype-Specific Manner., *PLoS ONE*, 7(1): e29653.
93. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*; 21: 137- 148.

94. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol., 3: 991-8.
95. Dvorak H (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. New England Journal of Medicine, 315(26): 1650-1659.
96. Dwivedi S, Goel A, Natu SM, Mandhani A, Khattri S, Pant KK (2011) Diagnostic and prognostic significance of prostate specific antigen and serum interleukin 18 and 10 in patients with locally advanced prostate cancer: a prospective study. Asian Pac J Cancer Prev., 12(7):1843–8.
97. Dwyer R, Potter-Beirne S, Harrington K, Lowery A et al. (2007) Monocyte chemotactic protein- 1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells., Clinical Cancer Research, 13(17): 5020-5027.
98. Dziurzynski K, Chang SM, Heimberger AB, Kalejta RF, McGregor Dallas SR, Smit M, Soroceanu L, Cobbs CS (2012) Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. Neuro-oncology, 14, 246–255.
99. Edman K, Furber M, Hemsley P, Johansson C et al. (2011) The discovery of MMP7 inhibitors exploiting a novel selectivity trigger., ChemMedChem, 6 (5): 769–73.
100. Ehrmann J, Kolar Z, and Mokry J (2005) Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. J. Clin. Pathol. 58, 222–223
101. El Andaloussi A and Lesniak MS (2007) CD4+ CD25+ FoxP3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. J. Neurooncol., 83(2), 145–152.
102. Ellingsworth LR, Brennan JE, Fok K, Rosen DM, Bentz H, Piez KA, Seyedin SM (1986) Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor A and transforming growth factor beta. Immunohistochemical localization and association with differentiating cells. J Biol Chem, 261:12362-12367.
103. Elliott LH, Brooks WH, Roszman TL (1992) Suppression of high affinity IL-2 receptors on mitogen activated lymphocytes by glioma derived suppressor factor. J. Neurooncol., 14: 1-7.
104. Ehtesham M, Mapara KY, Stevenson CB, and Thompson RC (2009) CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. Cancer Lett., 274(2), 305–312.
105. Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A et al. (2006) Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. Cell Death Differ. 13: 1238–1241.
106. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC (1992) Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis, Am. J. Pathol. 140: 539–544.
107. Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF, Xie W, Friedman AH, Archer GE, Herndon JE, Bigner DD, Dranoff G, Sampson JH (2006) Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. Cancer Res. 66(6): 3294–3302.
108. Felderhoff-Mueser U, Schmidt OI, Oberholzer A, Bühner C, Stahel PF (2005) IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration? Trends Neurosci., 28(9):487–93.
109. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med., 170:2081–2095.

110. Fisk HA, Mattison CP, Winey M (2002) Centrosomes and tumour suppressors. *Curr Opin Cell Biol*, 14:700–5.
111. Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, Hoffman RM, Kerbel RS (2009) Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Research*, 69: 7243-7251.
112. Fomchenko EI and Holland EC (2006) Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin. Cancer Res.* 12: 5288.
113. Foxwell BM, Woerly G, Ryffel B (1989) Identification of interleukin 4 receptor-associated proteins and expression of both high- and low-affinity binding on human lymphoid cells. *Eur J Immunol* 19:1637–1641.
114. Frank DA (2007) STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Letters*, 251:199–210.
115. Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke1 E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman MH, Verma IM (2012) Dedifferentiation of Neurons and Astrocytes by Oncogenes Can Induce Gliomas in Mice. *Science*, 338(6110): 1080-1084.
116. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.*, 21:2683–710.
117. Gabrilovich DI and Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9(3): 162–174.
118. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.*, 64: 7011 –7021.
119. Gastineau D, Allan B, DietzHambardzumyan D, Squatrito M, Carbajal E, Holland EC (2008) Glioma formation, cancer stem cells, and akt signaling. *Stem Cell Rev.*, 4: 203–210.
120. Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995) Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 20:269–287.
121. Gery I and Waksman BH (1972) Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J Exp Med.*, 136:143-55.
122. Gilbert CA and Ross AH (2009) Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem.*, 108(5):1031-8.
123. Gilbert CA and Ross AH (2011) Glioma Stem Cells: Cell Culture, Markers and Targets for New Combination Therapies. *Cancer Stem Cells Theories and Practice*, edited by Prof. Stanley Shostak, InTech.
124. Glezer I, Rivest S, Xavier A (2015) CD36, CD44 and CD 83 expression and putative function in neural tissues. *Neural Surface Antigens: From Basic Biology Towards Biomedical Applications*, Jan Pruszek, Elsevier.
125. Goffart N, Kroonen J, Rogister B (2013) Glioblastoma-Initiating Cells: Relationship with Neural Stem Cells and the Micro-Environment *Cancers*, 5: 1049-1071.
126. Golestaneh N, Mishra B (2005) TGFbeta, neuronal stem cells and glioblastoma: *Oncogene*, 24(37):5722-30.

127. Goswami S, Gupta A, Sharma SK (1998) Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *J. Neurochem.*, 71: 1837–1845.
128. Grant GA and Janigro D (2004) The blood-brain barrier. In: *Youman's neurological surgery*. 5th ed. Winn HR. (Ed.) Philadelphia (PA): WB Saunders; 153-173.
129. Grauer OM, Nierkens S, Bennink E, Toonen LW, Boon L, Wesseling P, Suttmuller RP, Adema GJ (2007) CD4+FoxP3+ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. *Int. J. Cancer*, 121(1), 95–105.
130. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B (2005) Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med*; 11: 328-334.
131. Griguer CE, Oliva CR, Gobin E, Marcorelles P, Benos DJ, Lancaster JR, Gillespie GY (2008) CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PLoS One* 3, e3655.
132. Gomez GG and Kruse CA (2006) Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression. *Gene Ther. Mol. Biol.*, 10: 133–146.
133. Graeber MB, Streit WJ, Buringer D et al. (1992) Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II perivascular cells in histologically normal human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 51:303–31.
134. Greenberg H, Chandler WF, Sandler HM (1999) Brain tumors, Contemporary neurology series. Oxford University Press Inc.
135. Greenfield's Neuropathology, 8th Edition by Seth Love, David Louis and David Ellison, 2008, Hodder Arnold.
136. Grohmann U, Fallarino F, Bianchi R, Belladonna ML, Vacca C, Orabona C, Uyttenhove C, Fioretti MC, Puccetti P (2001) IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 alpha+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol*, 167:708-714.
137. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P (2002) CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*, 3:1097-1101.
138. Günther H, Schmidt N, Phillips H, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, et al. (2008) Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*, 27(20):2897–909.
139. Gürsel D, Shin B, Burkhardt J, Kesavabhotla K, Schlaff C and Boockvar J (2011) Glioblastoma Stem-Like Cells—Biology and Therapeutic Implications. *Cancers*, 3: 2655-2666.
140. Gustafson M, Lin Y, New KC, Bulur PA, O'Neill BP (2010) Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>lo</sup>/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone. *Neuro-Oncology*, 12(7):631–644.
141. Hagemann C, Anacker J, Ernestus RI and Vince GA (2012) A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World J Clin Oncol.*, 3(5): 67–79.
142. Halasz M, Polgar B, Berta G, Czimbalek L, Szekeres-Bartho J (2013) Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cell Mol Life Sci*, 70:4617–4630.

143. Hao C, Parney IF, Roa WH, Turner J, Petruk KC, Ramsay DA (2002) Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas: evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine dysregulation. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 103(2):171-8.
144. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM and Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-1132.
145. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G von Deimling A (2009) Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: A study of 1010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathologica*, 118: 469-474.
146. Hatterer E, Davoust N, Didier-Bazes M, Vuillat C, Malcus C, Belin MF, Nataf S (2006). How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood*, 107: 806–812.
147. Hau P, Jachimczak P, Schlaier J, Bogdahn U (2011) TGF-beta2 signaling in highgrade gliomas, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 12(12):2150-7.
148. Haybaeck J, Obrist P, Schindler CU, Spizzo G. and Doppler W (2007) STAT-1 Expression in Human Glioblastoma and Peritumoral Tissue. *Anticancer Research*, 27: 3829-3836
149. Hayden EC (2010) Genomics boosts brain-cancer work. *Nature* 463(7279), 278.
150. He D, Li H, Yusuf N, Elmets CA et al. (2010) IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 184: 2281-2288.
151. He D, Li H, Yusuf N, Elmets CA, Athar M et al. (2012) IL-17 mediated inflammation promotes tumor growth and progression in the skin. *PLoS One*, 7: e32126.
152. He XC, Zhang J and Li L (2005) Cellular and molecular regulation of hematopoietic and intestinal stem cell behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1049: 28-38.
153. Heimberger AB, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C, Yang DS, Sun W, Qiao W, Hiraoka N, Fuller GN (2008) Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. *Clin. Cancer Res.*, 14(16): 5166–5172.
154. Heimberger AB, Kong L-Y, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C, Yang DS, Wei J, Qiao W, Schmittling RJ, Archer GE, Sampson JH, Hiraoka N, Priebe W, Fuller GN, Sawaya R (2009) The role of tregs in human glioma patients and their inhibition with a novel STAT-3 inhibitor. *Clin. Neurosurg.*, 56: 98–106.
155. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, and Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334:297–314.
156. Held-Feindt J, Hattermann K, Muerkoster SS et al. (2010) CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). *Experimental Cell Research*, 316(9): 1553–1566.
157. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 15178-15183.

158. Herrera B and Inman GJ (2009) A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. BMC Cell Biol., 10:20.
159. Hickey W F and Kimura H (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone-marrow derived and present antigen in vivo. Science, 239: 290–292.
160. Hishii M, Nitta T, Ishida H, Ebato M, Kurosu A, Yagita H, Sato K, Okumura K (1995) Human glioma-derived interleukin-10 inhibits antitumor immune responses in vitro. Neurosurgery, 37: 1160-1166.
161. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL (2005) The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. Eur. J. Cancer, 41: 2502–2512.
162. Hong X, Chedid K, Kalkanis SN (2012) Glioblastoma cell line-derived spheres in serum containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. Int J Oncol., 41(5):1693-700.
163. Horejsi V, Cebecauer M, Cerny JE, Brdiejka T et al. (1998) Signal transduction in leucocytes via GPI-anchored proteins: an experimental artefact or an aspect of immunoreceptor function? Immunol Lett, 63:63–73.
164. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC et al. (1994) An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4. Stat Sci, 265:1701–1706.
165. Huang S (2007) Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications. Clin. Cancer Res., 13(5): 1362–1366.
166. Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. Trends Neurosci 2001, 24: 719-725.
167. Huettner C, Paulus W, Roggendorf W (1995) Messenger RNA expression of the immunosuppressive cytokine IL-10 in human gliomas. Am. J. Pathol., 146: 317–322.
168. Huettner C, Czub S, Kerkau S, Roggendorf W, Tonn JC (1997) Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. Anticancer Res., 17: 3217-3224.
169. Huntly BJP and Gilliland DG (2005) Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. Nature Reviews Cancer, 5(4): 311–321.
170. Hussain SF, Yang D, Suki D, Grimm E, Heimberger AB (2006) Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients. J. Transl. Med., 4: 15.
171. Ifergan I, Kébir H, Bernard M, Wosik K, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Arbour N, Prat A (2008) The blood–brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. Brain, 131(3): 785-99.
172. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA (2002) Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. Glia, 39: 193-206.
173. Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DW, Vandenberg S, et al. (2010) Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. Genes Dev., 24:1731–45.

174. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I, Kyurkchiev DS (2009) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Immunol. Lett., 126, 37-42.
175. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimnitrov R, Belemezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, Kinov P, Altankova I, Kyurkchiev D (2012) Conditioned medium from adipose tissue derived mesenchymal stem cells induces CD4 FoxP3 cells and increases IL-10 secretion. J Biomed Biotechnol 2012:1–8.
176. Iwami K, Natsume A, Wakabayashi T (2011) Cytokine networks in glioma. Neurosurg Rev, 34: 253–264.
177. Jackson DE (2003) The unfolding tale of PECAM-1. FEBS Lett., 540 (1–3): 7–14.
178. Jacobs JFM, Idema AJ, Bol KF, Nierkens S, Grauer OM, Wesseling P, Grotenhuis JA, Hoogerbrugge PM, de Vries IJM, Adema GJ (2009) Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors. Neuro Oncol. 11(4), 394–402.
179. Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA (1978) Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. Journal of the Neurological Sciences, 35 (1): 147–55.
180. Jeffes EW, Beamer YB, Jacques S, Silberman RS, Vayuvegula B, Gupta S, Coss JS, Yamamoto RS, Granger GA (1993) Therapy of recurrent high grade gliomas with surgery, and autologous mitogen activated IL-2 stimulated killer (MAK) lymphocytes: I. Enhancement of MAK lytic activity and cytokine production by PHA and clinical use of PHA. J. Neurooncol., 15, 141–155.
181. Jenkins MK, Chen CA, Jung G, Mueller DL, Schwartz RH (1990) Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. J Immunol, 144:16-22.
182. Lohr J, Ratliff T, Huppertz A, Ge Y, Dictus C, Ahmadi R, Grau S, Hiraoka N, Eckstein V, Ecker RC, Korff T, von Deimling A, Unterberg A, Beckhove P, Herold-Mende C (2011) Effector T-Cell Infiltration Positively Impacts Survival of Glioblastoma Patients and Is Impaired by Tumor-Derived TGF- $\beta$  Clin Cancer Res, 17(13): 4296-4308.
183. Jensen RL, Ragel BT, Whang K, Gillespie D (2006) Inhibition of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas. Journal of Neuro-Oncology, 78, 233-247.
184. Jeon GS, Park SK, Park SW, Kim DW, Chung CK, Cho SS (2008) Glial expression of interleukin-18 and its receptor after excitotoxic damage in the mouse hippocampus. Neurochem Res., 33(1): 179–84.
185. Jiang H and Chess L (2006) Regulation of immune responses by T cells. N. Engl. J. Med. 354, 1166–1176.
186. Jiang X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, Mao N (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. – Blood, 105(10): 4120-4126.

187. Johnston PA and Grandis JR (2011) STAT3 SIGNALING: Anticancer Strategies and Challenges. *Molecular interventions*, 11(1): 18-26.
188. Joy A, Moffett J, Neary K, Shapiro J, Coons S, Mordechai E, Stachowiak EK, Stachowiak MK (1997) Nuclear accumulation of FGF-2 is associated with proliferation of human astrocytes and glioma cells. *Oncogene*, 14:171–183.
189. Justilien V, Regala RP, Tseng I-C, Walsh MP, et al. (2012) Matrix Metalloproteinase-10 Is Required for Lung Cancer Stem Cell Maintenance, Tumor Initiation and Metastatic Potential. *PLoS ONE*, 7(4): e35040.
190. Kallioniemi O, Wagner U, Kononen J and Sauter G (2001) Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics*, 10(7): 657-66222.
191. Kaminska B, Wesolowska A, and M Danilkiewicz (2005) TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim. Pol.*, 52(2):329-37.
192. Kang JS, Bae SY, Kim HR, Kim YS, Kim DJ, Cho BJ, et al. (2009) Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. *Carcinogenesis*, 30(12):1987–96.
193. Kania G, Corbeil D, Fuchs J (2005) Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell derived progenitors. *Stem Cells*, 23, 791–804.
194. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E et al. (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 7556-7561.
195. Kargiots O, Rao JS, Kryitsis AP (2006) Mechanisms of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol*, 78:281–293.
196. Kasahara T, Mukaida N, Yamashita K, Yagisawa H, Akahoshi T, Matsushima K (1991) IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology*, 74: 60–67.
197. Kashiwamura S, Ueda H, Okamura H (2002) Roles of interleukin-18 in tissue destruction and compensatory reactions. *J Immunother.*, 25:S4–11.
198. Kehlen A, Thiele K, Riemann D, Rainov N, Langner J (1999) Interleukin 17 stimulates the expression of I kappa B alpha mRNA and the secretion of IL-6 and IL-8 in glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol.*, 100(1): 1-6.
199. Kelly JJP, Stechishin O, Chojnacki A, Lun X, Sun B, Senger DL, Forsyth P, Auer RN, Dunn JF, Cairncross JG, Parney IF, Weiss S (2009) Proliferation of human glioblastoma stem cells occurs independently of exogenous mitogens. *Stem Cells*, 27: 1722–1733.
200. Khodarev NN, Beckett M, Labay E, Darga T, Roizman B, et al. (2004) STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1714–1719.
201. Khodarev NN, Minn AJ, Efimova EV, Darga TE et al. (2007) Signal transducer and activator of transcription 1 regulates both cytotoxic and prosurvival functions in tumor cells. *Cancer Res.*, 67(19):9214-20.

202. Khoshyomn S, Penar PL, Wadsworth MP, Taatjes DJ (1997) Localization of CD44 at the invasive margin of glioblastomas by immunoelectron microscopy. *Ultrastruct. Pathol.* 21(6), 517–525.
203. Kim JE, Patel M, Ruzevick J, Jackson CM and Lim M (2014) STAT3 Activation in Glioblastoma: Biochemical and Therapeutic Implications, *Cancers*, 6(1): 376-395.
204. Kim K, Rhee K (2011) The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole. *J Cell Sci*, 124:338–347.
205. Kim KE, Song H, Hahm C, Yoon SY, Park S, Lee HR, et al. (2009) Expression of ADAM33 is a novel regulatory mechanism in IL-18-secreted process in gastric cancer. *J Immunol.*, 182(6):3548–55.
206. Kinjyo I, Inoue H, Hamano S, Fukuyama S, Yoshimura T, Koga K, Takaki H, Himeno K, Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A (2006) Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J. Exp. Med.*, 203: 1021–1031.
207. Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffan RM, Harsh GR, Brown JM (2010) Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice, *Journal of Clinical Investigation*, 120(3): 694–705.
208. Kitahara T, Watanabe O, Yamaura A (1987) Establishment of interleukin 2 dependent cytotoxic T lymphocyte cell line specific for autologous brain tumor and its intracranial administration for therapy of the tumor, *Journal of Neuro Oncology*, 4(4): 329–336.
209. Kleihues P, Cavenee WK (2000) Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
210. Kmiecik J, Poli A, Brons NHC, Waha A, Eide GE, Enger PO, Zimmer J, Chekenya M (2013) Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level *J. Neuroimmunol.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.08.013>
211. Koev I, Slavov E, Staykov D, Halacheva K, Sarafian V (2010) Immune response in malignant glioma, *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)*, 16(3): 3-7.
212. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M (2008) Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *Journal of Pathology*, 216(1): 15–24.
213. Komohara Y, Horlad H, Ohnishi K, Fujiwara Y et al. (2012) Importance of direct macrophage-tumor cell interaction on progression of human glioma. *Cancer Sci.*, 103: 2165–2172.
214. Korkaya H, Liu S, Wicha M (2011) Regulation of Cancer Stem Cells by Cytokine Networks: Attacking Cancers Inflammatory Roots. *Clin Cancer Res*, 17(19): 6125–6129.
215. Krivtsov AV and Armstrong SA (2012) Can One Cell Influence Cancer Heterogeneity?, *Science*, 338, 1035-1036.
216. Kuehn BM (2010) Genomics illuminates a deadly brain cancer. *JAMA* 303(10), 925–927.

217. Kuppner MC, van Meir E, Hamou MF, de Tribolet N (1990) Cytokine regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on human glioblastoma cells., Clin Exp Immunol, 81(1):142–148.
218. Kushchayev SV, Kushchayeva Y S, Wiener PC, Badie B, and. Preul MC (2012) Monocyte-derived cells of the brain and malignant gliomas: the double face of Janus. World Neurosurgery, 2014, 82(6):1171-86.
219. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev S (2010) New target cells of the immunomodulatory effects of progesterone. Reproductive biomedicine online, 21(3): 304-311.
220. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev S (2011) Effect of progesterone on human mesenchymal stem cells. Academic Press, Burlington, 87: 217–234.
221. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Kyurkchiev S (2013) Differences between adipose tissue derived mesenchymal stem cells and bone marrow derived mesenchymal stem cells as regulator of the immune response. Stem Cells Cancer Stem Cells, 10:71–84.
222. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M et al. (2014) Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. World J Stem Cells., 6(5): 552–570.
223. Lachmann M, Gelbmann D, Kalman E , Polgar B et al. (2004) PIBF (Progesterone induced bloking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. Int. J. Cancer, 112, 51– 60.
224. Laimer K, Spizzo G, Obrist P, Gastl G et al. (2007) STAT1 activation in squamous cell cancer of the oral cavity: a potential predictive marker of response to adjuvant chemotherapy. Cancer, 110(2): 326–333.
225. Lapointe TK and Buret AG (2012) Interleukin-18 facilitates neutrophil transmigration via myosin light chain kinase-dependent disruption of occludin, without altering epithelial permeability. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 302(3):G343–51.
226. Lassman A and Holland E (2005) Glioblastoma multiforme-past, present and future. US Oncology Review., 1(1):109-111.
227. Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF (1993) Bone marrow derived elements and microglia in brain inflammation. Glia, 7: 19–24.
228. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W et al. (2006) 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: 391-403.
229. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, et al. (2006) Control of developmental regulators by polycomb in human embryonic stem cells. Cell, 125: 301–313.
230. Leeman RJ, Lui VW, Grandis JR (2006) STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. Expert Opin Biol Ther, 6:231–241.
231. Leenstra S, Das PK, Troost D, de Boer OJ, Bosch DA (1995) Human malignant astrocytes express macrophage phenotype. J. Neuroimmunol., 56: 17–25.

232. Lei L, Sonabend AM, Guarnieri P, Soderquist C et al. (2011) Glioblastoma Models Reveal the Connection between Adult Glial Progenitors and the Proneural Phenotype, PLoS ONE 6, e20041
233. Levy NL (1978) Cell mediated cytotoxicity and serum mediated blocking: evidence that their associated determinants on human tumor cells are different: J. Immunol., 121:916-922.
234. Levy DE and Lee C (2002) What does Stat3 do? J. Clin. Invest. 109(9), 1143–1148.
235. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK (2003) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis, J. Immunol., 170: 3369– 3376.
236. Li L, Dutra A, Pak E, Labrie JE, Gerstein RM, Pandolfi PP, Recht LD, Ross AH (2009) EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors. Neuro Oncol. 11, 9–21.
237. Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yarden Y, Schlessinger J, Soreq H (1984) Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. Cancer Res., 44:753–60.
238. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, et al. (1985) Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. Nature., 313:144–7.
239. Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS (1996) GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination, Neuron, 17 (4): 607–15.
240. Listi F, Candore G, Lio D, Cavallone L et al. (2004) Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) polymorphisms and acute myocardial infarction: a study in patients from Sicily., Eur J Immunogenet, 31(4):175–178.
241. Liu C, Yu S, Kappes J, Wang J, Grizzle WE, Zinn KR, Zhang HG (2007) Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. Blood, 109 (10): 4336-42.
242. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, et al. (2011) Breast Cancer Stem Cells Are Regulated by Mesenchymal Stem Cells through Cytokine Networks. Cancer Res., 71: 614-24.
243. Liu Z, Hu X, Cai J, Liu B, Peng X, Wegner M, Qiu M (2007) Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: Evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms. Developmental Biology, 302, 683-693.
244. Liu C, Sage JC, Miller MR, Verhaak RG et al., (2011) Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. Cell, 146, 209.
245. Logue EC and Sha WC (2004) CD28-B7 bidirectional signaling: a two-way street to activation. Nat Immunol, 5:1103-1105.
246. Long DM (1970) Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier inhuman malignant brain tumors. J Neurosurg; 32: 127-144.
247. Louis D N, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System - Acta Neuropathol., 114(2): 97-109.

248. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD et al. (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels, *Nature*, 523: 337–341.
249. Lyons JG, Lobo E, Martorana AM, Myerscough MR (2008) Clonal diversity in carcinomas: its implications for tumour progression and the contribution made to it by epithelial-mesenchymal transitions. *Clin Exp Metastasis.*, 25:665–77.
250. MacPherson G, Kushnir N, Wykes M (1999) Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunol Rev*, 172:325-334.
251. Maldonado-Lopez R, Moser M (2001) Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin Immunol*, 13:275-282.
252. Margni R, Binaghi R (1988) Non-precipitating asymmetric antibodies. *Annu Rev Immunol*, 6:535–554.
253. Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2003) Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med*, 198: 615-621.
254. Martone T, Bellone G, Pagano M, Beatrice F, Palonta F, Emanuelli G, et al. (2004) Constitutive expression of interleukin-18 in head and neck squamous carcinoma cells. *Head Neck.*, 26(6):494–503.
255. Maruno M, Kovach JS, Kelly PJ, Yanagihara T (1997) Distribution of endogenous tumour necrosis factor alpha in gliomas, *J. Clin. Pathol.*, 50: 559–562.
256. Mazzoleni S, Politi LS, Pala M, Cominelli M, Franzin A, Sergi L, Falini A, De Palma M, Bulfone A, Poliani PL, Galli R (2010) Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer Research*, 70, 7500-7513.
257. McLendon R and Rich J (2011) Glioblastoma Stem Cells: A Neuropathologist’s View. *Journal of Oncology*, 2011, Article ID 397195, 8 pages.
258. Mendez-Fernandez YV, Hansen MJ, Rodriguez M, Pease LR (2005) Anatomical and cellular requirements for the activation and migration of virus-specific CD8+ T cells to the brain during Theiler’s virus infection. *J. Virol.*, 79, 3063–3070.
259. Mescher MF, Popescu FE, Gerner M, Hammerbeck CD, Curtsinger JM (2007) Activation-induced nonresponsiveness (anergy) limits CD8 T cell responses to tumors. *Semin Cancer Biol*, 17: 299-308;
260. Messam CA, Hou J, Major EO (2000) Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody. *Exp. Neurol.*, 161, 585–596.
261. Michalczyk K and Ziman M (2005) Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organization. *Histol. Histopathol.*, 20 (2): 665–71.
262. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R (1994) TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol*, 127:2021–2036.

263. Miko E, Halasz M, Jericevic-Mulac B, Wicherek L, Arck P, Arato G, Skret Magierlo J, Rukavina D, Szekeres-Bartho J (2011) Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *J Reprod Immunol*, 90: 50–57.
264. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, GarciaVerdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, 3: 265-278.
265. Mittelbronn M, Simon P, Loffler C, Capper D, Bunz B, Harter P, Schlaszus H, Schleich A, Tabatabai G, Goepfert B, Meyermann R, Weller M, Wischhusen J (2007) Elevated HLA-E levels in human glioblastomas but not in grade I to III astrocytomas correlate with infiltrating CD8+ cells. *J. Neuroimmunol.*, 189: 50–58.
266. Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M (2004) The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 15(1):61-76.
267. Mocellin S, Marincola FM, Young HA (2005) Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol.*, 78(5):1043-51.
268. Montero MT, Matilla J, Gómez-Mampaso E, Lasunción MA (2004) Geranylgeraniol regulates negatively caspase-1 autoprocessing: implication in the Th1 response against Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol.*, 173(8):4936–44.
269. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O' Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19: 683– 765.
270. Morse MA, Lyerly HK, Clay TM, Abdel-Wahab O, Chui SY, Garst J, Gollob J, Grossi PM, Kalady M, Mosca PJ, Onaitis M, Sampson JH, Seigler HF, Toloza EM, Tyler D, Vieweg J, Yang Y (2004) Immunotherapy of surgical malignancies. *Curr. Probl. Surg.*, 41: 15–132.
271. Motoyoshi Y, Kaminoda K, Saitoh O, Hamasaki K, Nakao K, Ishii N, Nagayama Y, Eguchi K (2006) Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncol. Rep.* 16(1), 141 –146.
272. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL (2002) Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*, 297:1867-1870.
273. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL (1999) Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*, 189:1363-1372.
274. Nagase H and Woessner JF (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.*, 274:21491–21494.
275. Nakahata A, Suzuki DE, Rodini CO, Pereira MCL, Janjoppi L, Okamoto OK (2011) Human Glioblastoma Cells Display Mesenchymal Stem Cell Features and Form Intracranial Tumors in Immunocompetent Rats. *Journal of Stem Cells*, 5(3): 103-11.
276. Nam JS, Terabe M, Kang MJ, Chae H et al. (2008) Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Res*, 68: 3915-3923.
277. Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194:23–28.

278. Ogata M, Zhang Y, Wang Y, Itakura M, Zhang YY, Harada A, Hashimoto S, Matsushima K. (1999) Chemotactic response toward chemokines and its regulation by transforming growth factor-beta1 of murine bone marrow hematopoietic progenitor cell-derived different subset of dendritic cells. *Blood*, 93:3225-3232.
279. Ogden AT, Horgan D, Waziri A, et al. (2006) Defective receptor expression and dendritic cell differentiation of monocytes in glioblastomas. *Neurosurgery.*, 59:902–910.
280. Ohgaki H and Kleihues P (2009) Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.*, 100(12), 2235.
281. Old LJ (1981) Cancer immunology: the search for specificity-G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res*, 41: 361-375.
282. Okada H, Kalinski P, Ueda R, Hoji A, Kohanbash G, Donegan TE, Mintz AH, Engh JA, Bartlett DL, Brown CK, Zeh H, Holtzman MP et al. (2011) Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with {alpha}-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma, *J. Clin. Oncol.*, 29: 330–336.
283. Okada M, Saio M, Kito Y et al. (2009) Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1. *International Journal of Oncology*, 34(6): 1621–1627.
284. Okamoto M, Azuma K, Hoshino T, Imaoka H, Ikeda J, Kinoshita T, et al. (2009) Correlation of decreased survival and IL-18 in bone metastasis. *Intern Med.*, 48(10):763–73.
285. Oreffo ROC, Cooper C, Mason C, Clements M (2005) Mesenchymal stem cells Lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Reviews*, 1(2): 169-178.
286. Ostrand-Rosenberg S and Sinha P (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.*, 182: 4499–4506.
287. Paetau A, Elovaara I, Paasivuo R, Virtanen I, Palo J, Haltia M (1985) Glial filaments are a major brain fraction in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis, *Acta Neuropathologica*, 65 (3-4): 190–94.
288. Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL, Signore M, Lombardi D, Todaro M, Stassi G, Martini M, Maira G, Larocca LM, DeMaria R (2008) Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin. Cancer Res.* 14(24), 8206–8212.
289. Paul G, Ozen I, Christophersen N, Reinbothe T, Bengzon J, Visse E, Jansson K, Dannaeus K, Henriques-Oliveira C, Roybon L, Anisimov S, Renstrom E, Svensson M, Haegerstrand A, Brundin P (2012) The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 7(4): 1-11.
290. Parajuli P and Sloan AE (2004) Dendritic Cell-Based Immunotherapy of Malignant Gliomas, *Cancer Investigation*, 22(3): 405–416.
291. Pardoll D (2003) Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol.*, 21:807-39.
292. Parney IF, Waldron JS, Parsa AT (2009) Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. *J. Neurosurg.* 110: 572–582.
293. Paul WE (1991) Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine, *Blood*, 77: 1859–1870.

294. Pavon L, Marti L, Sibov T, Miyaki L, Malheiros S, Mamani J (2012) Isolation, cultivation and characterization of CD133+ stem cells from human glioblastoma. *Einstein*, 10(2):197-202.
295. Persano L, Rampazzo E, Della Puppa A, Pistollato F, Basso G (2011) The three-layer concentric model of glioblastoma: Cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications. *Scientific World Journal*, 11: 1829-1841.
296. Piperi Ch, Zisakis A, Lea R, Kalofoutis A (2005) Role of Cytokines in the Regulation of Glioma Tumour Growth and Angiogenesis. *Am. J. Immunology*, 1(3): 106-113.
297. Polgár B, Nagy E, Mikó E, Varga P, Szekeres-Barthó J (2004) Urinary Progesterone-Induced Blocking Factor Concentration Is Related to Pregnancy Outcome. *Biology of Reproduction*, 71(5): 1699-1705.
298. Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 71 –78.
299. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M et al. (2009) Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell*, 4: 568-580.
300. Ponten J, Macintyre EH (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand.*, 74: 465–86.
301. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Portmann R, Mohr S et al. (2010) Turning placenta into brain: placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 202(3): 294.e1–294.e11
302. Price RL, Song J, Bingmer K, Kim TH, Yi JY, Nowicki MO, Mo X, Hollon T, Murnan E, Alvarez-Breckenridge C et al. (2013) Cytomegalovirus contributes to glioblastoma in the context of tumor suppressor mutations. *Cancer Res.*, 73: 3441–3450.
303. Purdy AK and Campbell KS (2009) Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biol. Ther.*, 8: 2211–2220.
304. Quesnelle KM, Boehm AL, and Grandis JR (2007) STAT-mediated EGFR signaling in cancer., *J Cell Biochem*, 102:311–319.
305. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.*, 3: 569-581.
306. Ranuncolo SM, Ladeda V, Specterman S, Varela M, Lastiri J, Morandi A, Matos E, Bal De Kier Joffe E, Puricelli L, Pallotta MG (2002) CD44 expression in human gliomas. *J. Surg. Oncol.*, 79: 30–36.
307. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG (2015) T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 74 (1):5-17.
308. Rapp M, Ozcan Z, Steiger HJ, Wernet P, Sabel MC, Sorg RV (2006) Cellular immunity of patients with malignant glioma: prerequisites for dendritic cell vaccination immunotherapy. *J Neurosurg.*, 105:41–50.
309. Raychaudhuri B and Vogelbaum MA (2011) IL-8 is a mediator of NF-kappaB induced invasion by gliomas, *J. Neuro-Oncol.*, 101: 227–235.

310. Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutierrez JA (2000) Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. Clin. Cancer Res., 6: 102–111.
311. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature, 414(6859): 105-11.
312. Reynes G, Vila V, Martin M, Parada A, Fleitas T, Reganon E, Martinez-Sales V (2011) Circulating markers of angiogenesis, inflammation, and coagulation in patients with glioblastoma, J. Neuro-Oncol., 102: 35–41.
313. Rice GE, Bevilacqua MP (1989) An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion., Science, 246:1303–1306.
314. Riedel F, Adam S, Feick P, Haas S, Götte K, Hörmann K, et al. (2004) Expression of IL-18 in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Int J Mol Med., 13(2):267–72.
315. Maldonado RA and von Andrian UH (2010) How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells, Advances in Immunology, 108: 111–165.
316. Rodrigues JC, Gonzalez GC, Zhang L, Ibrahim G, et al. (2010) Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties, Neurooncology, 12: 351–365.
317. Rodriguez-Menoca L, Faridi MH, Martinez L, Shehadeh LA, Duque JC, Wei Y, et al. (2014) Macrophage-derived IL-18 and increased fibrinogen deposition are age-related inflammatory signatures of vascular remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol., 306(5): H641 –53.
318. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR et al. (2010) An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. Cancer Cell., 17(1): 98.
319. Roessmann U, Velasco ME, Sindely SD, Gambetti P (1980) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study, Brain Research, 200 (1): 13–21.
320. Roggendorf W, Strupp S, Paulus W (1996) Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. Acta Neuropathol., 92: 288–293.
321. Rome C, Arsaut J, Taris C, Couillaud F, Loiseau H (2007) MMP-7 (matrilysin) expression in human brain tumors., Mol Carcinog., 46(6):446-52.
322. Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. Immunity 1999; 10: 281-287.
323. Roszman TL, Brooks WH, Elliott LH (1987) Inhibition of lymphocyte responsiveness by a glial tumor cell-derived suppressive factor. J. Neurosurg., 67: 874-879.
324. Roszman T, Elliott L, Brooks W. (1991) Modulation of T-cell function by gliomas. Immunol Today., 12: 370–374.
325. Rovina N, Hillas G, Dima E, Vlastos F, Loukides S, Veldekis D, et al. (2011) VEGF and IL-18 in induced sputum of lung cancer patients. Cytokine., 54(3): 277–81.

326. Rozenblum E, Vahteristo P, Sandberg T, Bergthorsson JT (2002) A genomic map of a 6-Mb region at 13q21–q22 implicated in cancer development: identification and characterization of candidate genes. Hum Genet, 110: 111–21.
327. Saidi A, Hagedorn M, Allain N, Verpelli C, Sala C, Bello L, Bikfalvi A, Javerzat S (2009) Combined targeting of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor potentially inhibits glioma growth and invasiveness, Int. J. Cancer, 125: 1054–1064.
328. Sakaguchi S (2004) Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu. Rev. Immunol., 22: 531–562.
329. Salmaggi A, Eoli M, Frigerio S, Sitrani A, Gelati M, Corsini E, Broggi G, Boiardi A (2003) Intracavitary VEGF, bFGF, IL- 8, IL-12 levels in primary and recurrent malignant glioma, J. Neurooncol., 62(3): 207- 303.
330. Samaras V, Piperi C , Korkolopoulou P, Zisakis A, Levidou G, Themistocleous MS, Boviatsis EI, Sakas DE, Lea RW, Kalofoutis A, Patsouris E (2007) Application of the ELISPOT method for comparative analysis of interleukin (IL)-6 and IL-10 secretion in peripheral blood of patients with astroglial tumors, Mol. Cell Biochem., 304: 343–351.
331. Samaras V, Piperi C, Levidou G, Zisakis A, Kavantzias N, Themistocleous MS, Boviatsis EI, Barbatis C, Lea RW, Kalofoutis A, Korkolopoulou P (2009) Analysis of interleukin (IL)-8 expression in human astrocytomas: associations with IL-6, cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and microvessel morphometry. Hum. Immunol., 70: 391–397.
332. Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, Friedman HS, Gilbert MR, Herndon JE, McLendon RE, Mitchell DA, Reardon DA, Sawaya R, Schmittling RJ, Shi W, Vredenburgh JJ, Bigner DD (2010) Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. J. Clin. Oncol., 28: 4722–4729.
333. Sanaï N, Alvarez-Buylla A, Berger MS (2005) Neural stem cells and the origin of gliomas. N. Engl. J. Med., 353: 811–822.
334. Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, et al. (2007) IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. J Clin Invest., 117: 3988-4002.
335. Sarkar S, Yong VW (2009) Inflammatory cytokine modulation of matrix metalloproteinase expression and invasiveness of glioma cells in a 3-dimensional collagen matrix, J Neurooncol, 91: 157–164.
336. Savage ND, de Boer T, Walburg KV, Joosten SA, van Meijgaarden K, Geluk A, Ottenhoff TH (2008) Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1, J. Immunol., 181: 2220–2226.
337. Schiffer D, Mellai M, Annovazzi L, Piazzini A, Monzeglio O, Caldera V (2012) Glioblastoma cancer stem cells: Basis for a functional hypothesis. Stem Cell Discovery, 2: 122-131.
338. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. (2006) Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. Scand J Immunol., 63:321-9.

339. Scheurer ME, Amirian E, Cao Y, Gilbert MR, Aldape KD, Kornguth DG, El-Zein R, Bondy ML (2008) Polymorphisms in the interleukin-4 receptor gene are associated with better survival in patients with glioblastoma. Clin. Cancer Res., 14: 6640–6646.
340. See AP, Han JE, Phallen J, Binder Z et al. (2012) The role of STAT3 activation in modulating the immune microenvironment of GBM. J. Neurooncol., 110: 359–368.
341. Segal BM, Glass DD, Shevach EM (2002) Cutting Edge: IL-10- producing CD4+ T cells mediate tumor rejection. J Immunol, 168:1–4.
342. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F (2008) Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. Stem Cells, 26: 212-222.
343. Shapiro JR, Yung WK, Shapiro WR. (1981) Isolation, karyotype, and clonal growth of heterogeneous subpopulations of human malignant gliomas. Cancer Res., 41:2349–59.
344. Sharabi A and Ghera NH (2010) Breaking tolerance in a mouse model of multiple myeloma by chemoimmunotherapy. Adv. Cancer Res., 107: 1–37.
345. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J (2010) A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. Cell, 141(1): 69-80.
346. Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: A quantitative analysis of niche cell-cell interactions. Cell Stem Cell, 3: 289-300.
347. Sherry MM, Reeves A, Wu JK, Cochran BH (2009) STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. Stem Cells, 27(10): 2383–2392.
348. Shrikant P and Benveniste EN (1996) The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. J. Immunol., 157: 1819–1822.
349. Shuai K (1999) The STAT family of proteins in cytokine signaling. Prog Biophys Mol Biol, 71: 405-422.
350. Siddesha JM, Valente AJ, Sakamuri SS, Gardner JD, Delafontaine P, Noda M, et al. (2014) Acetylsalicylic acid inhibits IL-18-induced cardiac fibroblast migration through the induction of RECK. J Cell Physiol., 229(7): 845–55.
351. Simonetta F, Chiali A, Cordier C, Urrutia A et al. (2010) Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. Eur J Immunol., 40(9): 2528-38.
352. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res., 63: 5821–5828.
353. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. Nature, 432: 396–401.
354. Sisodiya SM, Ragge NK, Cavalleri GL, Hever A, Lorenz B, Schneider A, Williamson KA, Stevens JM, Free SL, Thompson PJ, et al. (2006) Role of SOX2 mutations in human hippocampal malformations and epilepsy. Epilepsia, 47: 534–542.

355. Sotomayor EM, Borrello I, Rattis FM, Cuenca AG, Abrams J, Staveley-O'Carroll K, et al. (2001) Crosspresentation of tumor antigens by bone marrowderived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression. Blood, 98:1070- 7.
356. Srivastava MD, Thomas A, Srivastava BI, Check JH (2007) Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. Leuk Lymphoma, 48:1610–1617.
357. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, et al. (1998) Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 1178-83.
358. Sternlicht MD and Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol.,17: 463–516.
359. Stiles CD and Rowitch DF (2008) Glioma stem cells: A midterm exam. Neuron, 58: 832-846.
360. Stregé RJ, Godt C, Stark AM, Hugo HH, Mehdorn HM (2004) Protein expression of Fas, Fas ligand, Bcl-2 and TGFbeta2 and correlation with survival in initial and recurrent human gliomas. J. Neurooncol., 67(1-2): 29-39.
361. Studeny M, Marini F, Dembinski J, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele B, Champlin R, Andreeff M (2004) Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. Journal of the National Cancer Institute, 96(21): 1593-1603.
362. Sun W, Depping R and Jelkmann W (2014) Interleukin-1 b promotes hypoxia-induced apoptosis of glioblastoma cells by inhibiting hypoxia-inducible factor-1 mediated adrenomedullin production. Cell Death and Disease, 5: e1020.
363. Szekeres-Bartho J, Kilar F, Falkay G, Csernus V et al. (1985) The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity. I. progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. Am J Reprod Immunol Microbiol, 9: 15– 8.
364. Szekeres-Bartho J and Wegmann TG (1996) A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. J Reprod Immunol., 31(1-2): 81-95.
365. Szekeres-Bartho J and Polgar B (2010) PIBF: the double edged sword. Pregnancy and tumor. Am J Reprod Immunol, 64: 77–86.
366. Szelenyi J (2001) Cytokines and the central nervous system. Brain Research Bulletin, 54(4): 329-338.
367. Tamaki M, Aoyagi M, Morita I, Hirakawa K, Murota S (1995) Cell adhesion molecules acting between C6 glioma and endothelial cells. Journal of Neuro-Oncology, 24 (2):181-188.
368. Tamama K, Kawasaki H, Wells A (2010) Epidermal Growth Factor (EGF) Treatment on Multipotential Stromal Cells (MSCs). Possible Enhancement of Therapeutic Potential of MSC. Journal of Biomedicine and Biotechnology, Article ID 795385, 10 pages.
369. Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Iida H, Dohi S, Kozawa O (2010) Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. J. Neuroinflamm., 7, 16.

370. Tardy M, Fages C, Le Prince G, Rolland B, Nunez J (1990) Regulation of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding mRNA in the developing brain and in cultured astrocytes, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 265: 41–52.
371. Toh ML, Kawashima M, Zrioual S, Hot A, Miossec P and Miossec P (2009) IL-17 inhibits human Th1 differentiation through IL-12R beta 2 downregulation. *Cytokine*, 48: 226-230.
372. Torreggiani E, Lisignoli G, Manferdini C, Lambertini E et al. (2012) Role of Slug transcription factor in human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16 (4): 740–751.
373. Tsai MH, Cook JA, Chandramouli GV, DeGraff W, Yan H, et al. (2007) Gene expression profiling of breast, prostate, and glioma cells following single versus fractionated doses of radiation. *Cancer Res*, 67: 3845–3852.
374. Tso CL, Shintaku P, Chen J et al. (2006) Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res*, 4: 607–619.
375. Tsuboi K, Saijo K, Ishikawa E et al., (2003) Effects of local injection of ex vivo expanded autologous tumor-specific T lymphocytes in cases with recurrent malignant gliomas, *Clinical Cancer Research*, 9(9): 3294–3302.
376. Tsurushima H, Liu SQ, Tuboi K et al. (1999) Reduction of endstage malignant glioma by injection with autologous cytotoxic T lymphocytes. *Japanese Journal of Cancer Research*, 90(5): 536–545.
377. Tuccari G, Trombetta C, Giardinelli MM, Arena F, Barresi G (1986) Distribution of glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina. *Basic and Applied Histochemistry*, 30 (4): 425–32.
378. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97: 14720–14725.
379. Ulvestad EI, Williams K, Bø L, Trapp B, Antel J, Mørk S (1994) HLA class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ) on cells in the human CNS studied in situ and in vitro. *Immunology.*, 82(4): 535-41.
380. Vajkoczy P, Menger MD (2000) Vascular microenvironment in gliomas. *J Neurooncol*, 50: 99-108.
381. Valente AJ, Yoshida T, Izadpanah R, Delafontaine P, Siebenlist U, Chandrasekar B. (2013) Interleukin-18 enhances IL-18R/Nox1 binding, and mediates TRAF3IP2-dependent smooth muscle cell migration. Inhibition by simvastatin. *Cell Signal.*, 25(6): 1447–56.
382. Valente AJ, Sakamuri SS, Siddesha JM, Yoshida T, Gardner JD, Prabhu R, et al. (2013) TRAF3IP2 mediates interleukin-18-induced cardiac fibroblast migration and differentiation. *Cell Signal.*, 25(11): 2176–84.
383. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-1647.
384. Van Duivenvoorde LM, van Mierlo GJD, Boonman ZFHM, Toes REM (2006) Dendritic cells: Vehicles for tolerance induction and prevention of autoimmune diseases. *Immunobiology*, 211(6–8): 627–632.

385. Van Gool SW, Vandenberghe P, de Boer M, Ceuppens JL (1996) CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple step T cell activation model. Immunol Rev, 153:47–83.
386. Van Gool SW, Van den Hove L, Ceuppens JL (2000) Activation of the immune system in cancer patients. Med Pediatr Oncol, 34: 1–9.
387. Van Gool S, Maes W, Ardon H, Verschuere T, Van Cauter S, De Vleeschouwer S (2009) Dendritic Cell Therapy of High-Grade Gliomas. Brain Pathology, 19: 694–712.
388. Van Meir E, Sawamura Y, Diserens AC, Hamou MF, de Tribolet N (1990) Human glioblastoma cells release interleukin 6 in vivo and in vitro. Cancer Res., 20(20): 6683-8.
389. Van Wagoner NJ and Benveniste EN (1999) Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. J. Neuroimmunol., 100: 124–139.
390. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, et al. (2003) IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A., 100: 2645-50.
391. Vauleon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V (2010) Overview of Cellular Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Clinical and Developmental Immunology. 2010, Article ID 689171, 18pp.
392. Venkatesh K, Srikanth L, Vengamma B, Chandrasekhar C, Sanjeevkumar A, Mouleshwara Prasad BC, Sarma PV (2013) In vitro differentiation of cultured human CD34+ cells into astrocytes. Neurology India, 61 (4): 383–8.
393. Vitolo D, Paradiso P, Uccini S, Ruco LP, Baroni CD (1996) Expression of adhesion molecules and extracellular matrix proteins in glioblastomas: relation to angiogenesis and spread. Histopathology, 28: 521–528.
394. Vu TH, Werb Z (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev., 14: 2123–2133.
395. Wallace S, Oken M, Lunetta K, Panoskaltis-Mortari A, Masellis A (2001) Abnormalities of bone marrow mesenchymal stem cells in multiple myeloma patients. Cancer, 91(7): 1219-1230.
396. Wallet M, Sen P, Tisch R (2005) Immunoregulation of Dendritic Cells. Clinical Medicine & Research, 3(3): 166-175.
397. Wang JC (2007) Evaluating Therapeutic efficacy against cancer stem cells: New challenges posed by a new paradigm. Cell Stem Cell, 1: 497-501.
398. Wang, J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Rosland G, Thorsen F, Stuhr L, Molven A, Bjerkvig R, et al. (2008) CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. Int. J. Cancer, 122: 761 –768.
399. Wang S, Hong J-H, Hsueh C, Chiang C-S (2012) Tumorsecreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. Laboratory Investigation, 92(1): 151–162.
400. Wang ZY, Gaggero A, Rubartelli A, Rosso O, Miotti S, Mezzanzanica D, et al. (2002) Expression of interleukin-18 in human ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium: evidence for defective processing in tumor cells. Int J Cancer., 98(6):873–8.
401. Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H (2009) IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. J Exp Med, 206: 1457-1464.

402. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L et al. (2004) Regulation of the innate and adaptive immune responses by stat-3 signaling in tumor cells. *Nat. Med.*, 10: 48–54.
403. Wang H, Lathia JD, Wang J, Li Z, Heddleston JM, Eyles CE, Elderbroom J, Gallagher J, Schuschu J, MacSwords J, Cao Y, McLendon RE, Wang XF, Hjelmeland AB, Rich JN (2009) Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells*, 27: 2393–2404.
404. Waugh DJ and Wilson C (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.*, 14: 6735–41.
405. Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, Mottram P, Curiel T, Lange A, Zou W (2005) Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.*, 65(12): 5020– 5026.
406. Wei K-C, Huang C-Y, Chen P-Y, Feng L-Y, Wu T-WE, Chen S-M, Tsai H-C, Lu Y-J, Tsang N-M, Tseng C-K, Pai P-C, Shin J-W (2010) Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme. *Anticanc. Res.*, 30(1): 253–259.
407. Wei J, Barr J, Kong LY, Wang Y, Wu A, Sharma AK, Gumin J, Henry V, Colman H, Priebe W, Sawaya R, Lang FF, Heimberger AB (2010) Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Mol. Cancer Ther.*, 9(1), 67–78.
408. Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P et al. (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer’s and nondemented patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87: 5138–5143.
409. Weissenberger J, Loeffler S, Kappeler A, Kopf M, Lukes A, Afanasieva TA, Aguzzi A, Weis J (2004) IL-6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene*, 23: 3308–3316.
410. Weller R.O. (1998) Pathology of cerebrospinal fluid and interstitialfluid of the CNS: significance for Alzheimer disease, prion disordersand multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 885–894.
411. Wen P and Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359: 1850.
412. Westermark B, Ponten J, Hugosson R. (1973) Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand A.*, 81: 791–805.
413. Westermark B, Nister M, Heldin C (1985) Growth factors and oncogenes in human malignant glioma. *Neurol. Clinics*, 4 (3): 185–799.
414. Westermark B (2012) Glioblastoma—a moving target. *Upsala Journal of Medical Sciences.*, 117: 251–256.
415. Wheeler RD, Culhane AC, Hall MD, Pickering-Brown S, Rothwell NJ, Luheshi GN (2000) Detection of the interleukin 18 family in rat brain by RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res.*, 77(2): 290–3.
416. Wirjatijasa F, Dehghani F, Blaheta RA, Korf HW, Hailer NP (2002) Interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1-receptor antagonist but not transforming growth factor-beta induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells. *J. Neurosci. Res.*, 68: 579–587.

417. Woessner JF, Taplin CJ (1988) Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J. Biol. Chem.*, 263 (32): 16918–25.
418. Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Schoning B, Glockner F, Docke WD, Volk HD (1998) Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: effect of tumor extirpation. *J. Neuroimmunol.*, 84: 164-171.
419. Wu J, Lanier LL (2003) Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res*; 90: 127-156.
420. Wu A, Wiesner S, Xia J, Ericson K, Chen W, Hall WA, Low WC, Ohlfes JR (2007) Expression of MHC I and NK ligands on human CD133+ glioma cells: possible targets of immunotherapy. *J Neurooncol*, 83:121–131.
421. Wu A, Wei J, Kong L-Y, Wang Y, Priebe W, Qiao W, Sawaya R, Heimberger AB (2010) Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol.*, 12(11): 1113–1125.
422. Wu Y, Wang J, Scott P, Tredget E (2007) Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair and Regeneration*, 15(s1): 18-26.
423. Xu L, Chow KKH, Lim M, Current GL (2014) Vaccine Trials in Glioblastoma. *A Review Journal of Immunology Research*, 2014, Article ID 796856, 10 pages.
424. Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K (1997) Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells*, 15:144-153.
425. Yamanaka R, Tanaka R, Saitoh T, Okoshi S (1994) Cytokine gene expression on glioma cell lines and specimens. *J Neurooncol*, 21 : 243–247.
426. Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT (2010) Th role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *Journal of Clinical Neuroscience*, 17(1): 6–10.
427. Yeh WL, Lu DY, Liou HC, Fu WM (2012) A forward loop between glioma and microglia: glioma-derived extracellular matrix-activated microglia secrete IL-18 to enhance the migration of glioma cells. *J Cell Physiol.*, 227(2):558–68.
428. Yeung YT, Bryce NS, Adams S, Braidy N et al. (2012) p38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells. *J Neurooncol*, 109: 35–44.
429. Yokoyama Y, Grünebach F, Schmidt SM, Heine A et al. (2008) Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells. *Clin. Cancer Res.*, 14 (17): 5503–11.
430. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M (1997) Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol. Cell Biol.*, 17: 4015–4023.
431. Young HF, Sakalas R, Kaplan AM (1976) Inhibition of cell-mediated immunity in patients with brain tumors. *Surg. Neurol.*, 5: 19-23.
432. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*, 7: 41–51.

433. Yu H, Jove R (2004) The STATs of cancer—New molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 97–105.
434. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.*, 7: 41 –51.
435. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, WaschmannHogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 23: 9392-9400.
436. Yuan X, Hu J, Belladonna ML, Black KL, Yu JS (2006) Interleukin-23–Expressing Bone Marrow–Derived Neural Stem-Like Cells Exhibit Antitumor Activity against Intracranial Glioma, *Cancer Res*, 66(5): 2630-8.
437. Yung WK, Shapiro JR, Shapiro WR (1982) Heterogeneous chemosensitivities of subpopulations of human glioma cells in culture. *Cancer Res.*, 42:992–8.
438. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, et al. (2008) Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin. Cancer Res.*, 14: 123–129.
439. Zhang Y, Li Y, Ma Y, Liu S, She Y, Zhao P, et al. (2011) Dual effects of interleukin-18: inhibiting hepatitis B virus replication in HepG2.2.15 cells and promoting hepatoma cells metastasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 301(3):G565–73.
440. Zhang M, Song T, Yang L, Chen R, Wu L, Yang Z, Fang J (2008) Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 27: 85.
441. Zhu V, Yang J, LeBrun D, Li M (2012) Understanding the role of cytokines in Glioblastoma Multiforme pathogenesis. *Cancer Letters*, 316: 139–150.
442. Zou W (2005) Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.*, 5:263-74.
443. Zou JP, Morford LA, Chougnet C, Dix AR, Brooks AG, Torres N, Shuman JD, Coligan JE, Brooks WH, Roszman TH, Shearer GM (1999) Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *J. Immunol.*, 162(8):4882-92.
444. Park SJ, Takayuki Nakagawa, Hidemitsu Kitamura, Toru Atsumi, Hokuto Kamon, Shin-ichiro Sawa, Daisuke Kamimura, Naoko Ueda, Yoichiro Iwakura, Katsuhiko Ishihara, Masaaki Murakami and Toshio Hirano (2004) IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 Activation. *The Journal of Immunology*, 173(6): 3844-3854.